



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Borreliose de Lyme em cães e cavalos:
caracterização serológica e molecular em
animais assintomáticos**

Cátia Susana Semedo Patrício

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR, MEDICINA
TROPICAL E INTERNACIONAL

MARÇO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Borreliose de Lyme em cães e cavalos:
caracterização serológica e molecular em
animais assintomáticos**

Cátia Susana Semedo Patrício

Orientadora: Doutora Ana Amaro, Investigadora Auxiliar, Laboratório de Bacteriologia e Micologia, Laboratório Nacional de Referência para a Saúde Animal, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)

Coorientadora: Doutora Maria Luísa Vieira, Investigadora Auxiliar Responsável pelo Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa (UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade em Biologia Molecular, Medicina Tropical e Internacional

Parte dos resultados incluídos na presente Dissertação foram apresentados sob a forma de comunicação oral, na seguinte reunião científica:

Patrício C., Nunes M., Carreira T., Vieira M.L., Amaro A. (2016). Borreliose de Lyme em animais – Que risco para a saúde pública. Segunda edição do Workshop UNL /INSA Doenças Transmitidas por Vetores, organizado pela Universidade Nova de Lisboa e o Instituto Nacional de Saúde, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 19 de Outubro de 2016. *Abstract* disponível em:

[http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Documents/2016/Abril/II%20Workshop_NOVA.INSA_Do%C3%A7as%20Tranmitidas%20por%20Vetores.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Documents/2016/Abril/II%20Workshop_NOVA.INSA_Do%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Vetores.pdf)

Houve ainda lugar a uma colaboração na realização da componente laboratorial do trabalho conducente ao seguinte artigo:

Alho, A. M., Pita, J., Amaro, A., Amaro, F., Schnyder, M., Grimm, F., Custódio, A. C., Cardoso, L., Desplazes, P. and Carvalho, L. M., 2016. Seroprevalence of vector-borne pathogens and molecular detection of *Borrelia afzelii* in military dogs from Portugal. *Parasites & Vectors* 9: 225.

O presente trabalho está integrado no âmbito da Ação COST TD1303 EurNegVec.

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que me apoiaram ao longo deste ano, sem o qual não seria possível concretizar este trabalho, mas em especial:

À Investigadora Doutora Ana Amaro, orientadora desta Dissertação de Mestrado, por ter orientado o trabalho conducente à dissertação, e por toda a simpatia, disponibilidade, apoio e incentivo, que contribuíram para o meu enriquecimento pessoal, académico e científico.

À Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, co-orientadora desta Dissertação de Mestrado, por me integrar no seu grupo de trabalho e pelos conselhos a nível pessoal e profissional.

Às colegas da Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Teresa Carreira e Mónica Nunes, pela boa disposição, por todos os ensinamentos e paciência.

Ao Grupo de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) mas em especial à Licenciada Ivone Correia e à Mestre Lurdes Clemente, ao Doutor João, à Doutora Teresa Rocha, à Dona Lurdes, à Dona Alexandrina e à Dona Aldina e ao meu colega Vítor.

À Mestre Ana Margarida Alho da Faculdade de Medicina Veterinária e ao Doutor Jacinto Gomes do INIAV, pela cedência das amostras utilizadas neste trabalho, que contribuíram para um melhor entendimento da Borreliose de Lyme em animais.

Aos meus colegas de Mestrado, Patrícia Campos, Lúcia Figueira, Ricardo Conde, Joana Meda, Yulia e Marisa Lopes por todo o apoio e companheirismo nestes dois anos.

Aos meus pais, por todo o apoio, amizade e amor e por todos os ensinamentos que me deram que fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Por acreditarem sempre em mim dando-me força para seguir em frente.

Ao meu namorado e amigos, por toda a amizade, pelos momentos de descontração também importantes, por toda a preocupação e por partilharem comigo momentos importantes, sem vocês não seria possível.

Resumo

A Borreliose de Lyme (BL), causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) é, atualmente, a doença mais prevalente da Europa cujo o agente é transmitido por vetores Ixodídeos. É uma doença zoonótica, que afeta diversos hospedeiros vertebrados, entre os quais diversos animais domésticos e silváticos, bem como os humanos.

As espiroquetas responsáveis pela BL encontram-se, normalmente, associadas a pequenos mamíferos, aves e répteis que, enquanto hospedeiros reservatórios, possuem um papel essencial na transmissão e manutenção destes agentes na natureza. Por outro lado, os hospedeiros como o cão, cavalo e Homem têm um papel menos significativo na manutenção e transmissão do agente, sendo considerados hospedeiros acidentais.

A infecção por *B. burgdorferi* s.l. nos animais é geralmente assintomática, contudo, quando surgem manifestações clínicas, tais como febre e claudicação, estas são comuns a outras doenças, o que dificulta o diagnóstico clínico. Em muitos países, incluindo Portugal, esta doença é subdiagnosticada e pouco reportada, sendo por isso importante recorrer-se a um diagnóstico laboratorial.

O objetivo deste estudo foi caracterizar, por técnicas serológicas e moleculares, um total de 240 amostras séricas de duas populações de animais domésticos assintomáticos para a infecção por *B. burgdorferi* s.l.. Foram analisadas 114 amostras de cães e 126 amostras de cavalos, originárias de várias regiões de Portugal, caracterizadas em estudos anteriores para a presença de outros agentes transmitidos por vetores, particularmente carraças. A presença de anticorpos IgG anti-*B. burgdorferi* s.l. foi detetada pelas técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFA) e *Western Blot* (WB), utilizadas como teste de rastreio e teste confirmatório, respetivamente. A presença de DNA borreliano foi pesquisada pela técnica de *nested*-PCR por amplificação da região intergénica 5S-23S e amplificação parcial do gene *flaB*. Adicionalmente, foram também submetidas a *nested*-PCR para amplificação parcial de gene *ospC*, todas as amostras anteriormente positivas para qualquer um dos alvos genómicos testados.

A ocorrência de amostras com serologia positiva, ou seja, com título superior ou igual a 1:256, foi observada em 29 amostras de cães e em 31 amostras de cavalos, correspondendo a frequências de, aproximadamente, 25% para cada população. Dos 60 soros com imunofluorescência positiva foi confirmada, pela técnica de WB, uma amostra

pertencente a um cavalo da região de Lisboa. A presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. foi detetada, pelas técnicas moleculares, em 7% das amostras de cães e 5,6% das amostras de cavalos. Várias genoespécies foram identificadas, designadamente *B. afzelii*, em amostras de cães e cavalos, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* e *B. lusitaniae*, apenas em amostras de cavalos. Os distritos de Beja e Lisboa apresentaram o maior número de amostras positivas. Globalmente em 3,5% dos cães e 3,2% dos cavalos foram detetados anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. e identificado DNA de *B. burgdorferi* s.l..

Este estudo evidenciou a exposição ao vetor e o contacto com *B. burgdorferi* s.l. a que os animais em estudo estão sujeitos, sugerindo a existência de animais assintomaticamente infetados. Os resultados indicam que existem em circulação várias genoespécies em Portugal. No seu conjunto, os resultados obtidos são importantes pois alertam para o risco de BL nos animais e, uma vez que animais domésticos partilham habitats com os humanos, representam um potencial risco de Saúde Pública.

Palavras-chave: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Borreliose de Lyme, cães, cavalos, técnicas serológicas e técnicas moleculares

Abstract

Lyme Borreliosis (LB), caused by spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*B. burgdorferi* s.l.), is presently the most prevalent tick-borne disease in Europe. It is a zoonotic disease that affects several vertebrate hosts, including several domestic and sylvatic animals, as well as humans.

The spirochetes responsible for LB are usually associated with small mammals, birds and reptiles, as reservoir hosts, playing an essential role in the transmission and maintenance of these agents in nature. On the other hand, hosts such dog, horse and man are considered “dead-end” hosts and play an insignificant role in the transmission of the agent.

Borrelia burgdorferi s.l.-infected animals are usually asymptomatic, however, clinical manifestations such as fever and lameness may appear but they are common to other pathologies, making clinical diagnosis difficult. In many countries, including Portugal, this disease is underdiagnosed and poorly reported, and therefore it is also important to use the laboratory diagnosis.

The objective of this study was to characterize by serological and molecular techniques a total of 240 serum samples from two populations of asymptomatic domestic animals for infection for *B. burgdorferi* s.l.. A total of 114 dog samples and 126 horse samples from several regions of Portugal, which have previously been characterized for the presence of other tick-borne agents, was analysed. The presence of anti- *B. burgdorferi* s.l. IgG antibodies was detected by both Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and *Western Blot* (WB) techniques, used as screening and confirmatory tests, respectively. The presence of borreliac DNA was investigated by using *nested*-PCR targeting the 5S-23S rRNA intergenic spacer region and *flaB* gene. In addition, positive samples for any of these genomic targets were also submitted to *nested*-PCR for partial amplification of *ospC* gene.

The occurrence of serologically positive samples, with antibody titre greater than or equal to 1:256, was observed in 29 samples of dogs and 31 samples of horses, corresponding to frequencies of approximately 25% for each population. From the 60 sera with positive immunoreaction, a sample belonging to a horse from Lisbon region was confirmed by the WB technique. The presence of *B. burgdorferi* s.l. DNA was detected by molecular techniques in 7% of the dogs and 5.6% of the horses. Several genospecies

were identified namely *B. afzelii*, in both dog and horse populations, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* and *B. lusitaniae*, only in the horse population. The regions of Beja and Lisbon showed the highest number of positive samples. Globally, 3.5% of the dogs and 3.2% of the horses showed both antibodies anti- *B. burgdorferi* s.l. and DNA of *B. burgdorferi* s.l.

This study demonstrated that the populations of dogs and horses have contacted with *B. burgdorferi* s.l., and suggesting the presence of healthy animals infected with *B. burgdorferi* s.l.. It also indicating the presence are several genospecies in circulation in Portugal. The results obtained should alert to the risk of LB in domestic animals and also to humans, because they share the same habitats, representing a potential risk to both animal and public health.

Keywords: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lyme Borreliosis, dogs, horses, serological and molecular techniques

Índice geral	VII
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice.....	VII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Índice de Quadros.....	XIII
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	XV

Índice

1. Introdução	1
1.1 Justificação do tema e objetivos.....	1
1.2 Enquadramento histórico da Borreliose de Lyme.....	3
1.3 O agente etiológico – Espiroquetas do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	4
1.3.1 Características gerais.....	4
1.3.2 Classificação taxonómica.....	7
1.3.3 Distribuição geográfica.....	9
1.4 Aspetos epidemiológicos.....	10
1.5 Vetores ixodídeos do género <i>Ixodes</i>	12
1.6 Hospedeiros vertebrados.....	15
1.7 Manifestações clínicas.....	17
1.7.1 Humanos.....	18
1.7.2 Cães.....	19
1.7.3 Cavalos.....	20
1.8 Diagnóstico clínico.....	20
1.9 Diagnóstico laboratorial.....	21
1.9.1 Cultura e microscopia.....	21
1.9.2 Diagnóstico serológico.....	22
1.9.3 Diagnóstico molecular.....	25
1.10 Tratamento.....	26
1.11 Prevenção.....	27
2. Material e Métodos	29
2.1 Amostras Biológicas.....	29
2.1.1 Soros de cães.....	29
2.1.2 Soros de cavalos.....	30
2.2 Cultura de estirpes de referência <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	30
2.3 Testes serológicos.....	31
2.3.1 Imunofluorescência indireta (IFA) – teste de rastreio.....	31
• Preparação das lâminas de IFA.....	31

• Otimização do teste de IFA para <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	32
• Teste de IFA para <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	33
2.3.2 Western Blot (WB) – teste de confirmação.....	35
2.4 Testes moleculares.....	36
2.4.1 Extração de DNA de culturas de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. e de amostras biológicas	37
2.4.2 Detecção de DNA de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. por <i>nested-PCR</i>	38
• Determinação da sensibilidade analítica.....	38
• <i>Nested-PCR</i>	38
• Sequenciação.....	41
2.5 Análise e Tratamento de Dados.....	41
3. Resultados.....	43
3.1 Caracterização epidemiológica das populações animais em estudo.....	43
3.1.1 População de cães	43
3.1.2 População de cavalos.....	46
3.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> por IFA E WB	49
3.2.1 Imunofluorescência indireta (IFA)	49
• Otimização da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFA)..	49
• População de cães.....	50
• População de cavalos.....	52
3.2.2 Western Blot.....	54
• População de cães.....	55
• População de cavalos.....	56
3.3 Detecção molecular de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	56
3.3.1 Caracterização do DNA extraído.....	56
3.3.2 Determinação da sensibilidade analítica de <i>nested-PCR</i>	57
3.3.3 Amplificação de DNA borreliano por <i>nested-PCR</i>	58
• População de cães.....	58
• População de cavalos.....	59
3.3.4 Sequenciação de DNA de <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	61
• População de cães.....	61
• População de cavalos.....	62
3.4 Análise comparativa dos resultados.....	62
4. Discussão e Conclusões.....	65
5. Referências Bibliográficas.....	73
6. Anexos.....	85
Anexo 1- Tabela de interpretação do kit de WB para amostras de cães.....	85
Anexo 2- Tabela de interpretação do kit de WB para amostras de cavalos.....	86

Anexo 3- Tabela dos resultados positivos para as técnicas serológicas e moleculares para amostras de cães.....	87
Anexo 4- Tabela dos resultados positivos para as técnicas serológicas e moleculares para amostras de cavalos.....	88

Índice de Figuras

Figura 1.	Mapa-mundo com a indicação da localização da cidade de Lyme.....	3
Figura 2.	Imagem ilustrativa do genoma segmentado das bactérias do complexo de <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	5
Figura 3.	Expressão dos diferentes genes <i>ospA</i> , <i>ospC</i> e <i>VlsE</i> , que codificam as respetivas proteínas com o mesmo nome, durante o desenvolvimento da infeção.....	6
Figura 4.	Distribuição geográfica das genoespécies do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	9
Figura 5.	Distribuição da espécie <i>Ixodes ricinus</i> na Europa, janeiro 2016.....	12
Figura 6.	Distribuição geográfica da espécie <i>Ixodes ricinus</i> em Portugal Continental.....	13
Figura 7.	Ciclo zoonótico do vetor <i>Ixodes ricinus</i>	14
Figura 8.	Exemplos de hospedeiros reservatórios de <i>B. burgdorferi</i> s.l.	15
Figura 9.	Diagrama de transmissão de <i>B. burgdorferi</i> s.l. entre hospedeiros e vetores.....	16
Figura 10.	Imagem ilustrativa de Eritema Migrante.....	18
Figura 11.	Abordagem “two-steps” recomendada por Organizações Internacionais.....	23
Figura 12.	Tubos com cultura de espécies de <i>B. burgdorferi</i> s.l. em meio seletivo BSK.....	31
Figura 13.	Esquema ilustrativo da otimização da técnica de IFA para as diversas diluições do anticorpo primário e secundário.....	33
Figura 14.	Microfotografia de uma reação positiva em imunofluorescência (ampliação 1000x).....	35
Figura 15.	Imagem ilustrativa de uma membrana de nitrocelulose do kit comercial de <i>Western Blot</i> , com os diversos antígenos recombinantes de <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	35
Figura 16.	Representação geográfica dos locais de proveniência das amostras séricas de cães (n= 114).....	43
Figura 17.	Número e distribuição por distrito das amostras séricas de cães (n=114).....	44
Figura 18.	Número e distribuição das amostras séricas de cães: A) por grupo etário e B) por sexo.....	45
Figura 19.	Representação gráfica das características epidemiológicas da população de cães em estudo no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por vetores.....	46
Figura 20.	Representação geográfica dos locais de proveniência das amostras séricas de cavalos (n=126).....	47
Figura 21.	Número e distribuição por distrito das amostras séricas de cavalos (n=126).....	47
Figura 22.	Número e distribuição das amostras séricas de cavalos: A) por grupo etário e B) por sexo.....	48

Figura 23.	Representação gráfica das características epidemiológicas da população de cavalos em estudo no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por carraças.....	49
Figura 24.	Microfotografia ilustrativa da reação de imunofluorescência positiva (ampliação 1000x).....	50
Figura 25.	Esquema ilustrativo dos resultados obtidos na IFA para a população de cães.....	51
Figura 26.	Esquema ilustrativo dos resultados obtidos por IFA na população de cavalos.....	53
Figura 27.	Fotografia ilustrativa do resultado obtido pelo teste de <i>Western Blot</i> nas amostras de cães	55
Figura 28.	Fotografia ilustrativa do resultado obtido pela técnica de <i>Western Blot</i> nas amostras de cavalos.....	56
Figura 29.	Imagens ilustrativas do limite de deteção da técnica de <i>nested-PCR</i> 5S(<i>rrf</i>) – 23S (<i>rrl</i>) rRNA (A) e <i>flaB</i> (B) usando diluições seriadas de uma cultura de <i>B. afzelii</i>	57
Figura 30.	Gel de eletroforese representativo da amplificação de DNA por <i>nested-PCR</i> do espaço intergénico do 5S(<i>rrf</i>) – 23S (<i>rrl</i>) rRNA de <i>B. burgdorferi</i> s.l. em amostras de cães.....	58
Figura 31.	Distribuição geográfica das amostras de cães positivas por <i>nested-PCR</i> para deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	59
Figura 32.	Gel de eletroforese representativo da amplificação de DNA por <i>nested-PCR</i> do gene <i>flaB</i> de <i>B. burgdorferi</i> s.l. em amostras de cavalos.....	60
Figura 33.	Distribuição geográfica das amostras de cavalos positivas por <i>nested-PCR</i> para deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	61
Figura 34.	Esquema ilustrativo dos resultados obtidos pelas técnicas serológicas e moleculares para as amostras de cães.....	62
Figura 35.	Esquema ilustrativo dos resultados obtidos pelas técnicas serológicas e moleculares para as amostras de cavalos.....	63

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Genoespécies do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	8
Tabela 2.	Descrição das estirpes de referência do complexo de <i>B. burgdorferi</i> s.l. utilizadas no presente trabalho.....	30
Tabela 3.	Informação sobre as sequências oligonucleotídicas (<i>primers</i>) utilizadas na técnica de <i>nested</i> -PCR para <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	38
Tabela 4.	Número e frequência dos resultados obtidos pela técnica de IFA na população de cães.....	52
Tabela 5.	Número e frequência dos resultados obtidos pela técnica de IFA na população de cavalos.....	54

Índice de Quadros

Quadro 1.	Evidências clínicas e laboratoriais aconselhadas para validação do diagnóstico de Borreliose de Lyme de acordo com a manifestação clínica	21
Quadro 2.	Programa de amplificação para a região intergénica 5S-23S por <i>nested</i> -PCR.....	39
Quadro 3.	Programa de amplificação parcial do gene <i>flaB</i> por <i>nested</i> -PCR.....	40
Quadro 4.	Programa de amplificação para <i>ospC</i> por <i>nested</i> -PCR.....	40

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACA – Acrodermatite Crónica Atrófica

B. burgdorferi s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

BL – Borreliose de Lyme

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSK – Barbour - Stoenner - Kelly

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

DDO- Doença de Declaração Obrigatória

DGAV – Direção Geral de Agricultura e Veterinária

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EM – Eritema Migrante

EUA – Estados Unidos da América

EUCALB – European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis

fla – gene que codifica a flagelina

g – unidade de medida da força centrífuga relativa

GLBL – Grupo Leptospirose e Borreliose de Lyme

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IFA – Indirect Immunofluorescence Assay (Imunofluorescência indireta)

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

LCR-Líquido Cefalorraquidiano

nm - nanometro

Osp – *Outer surface proteins*

ospC - gene que codifica a proteína de superfície com o mesmo nome (OspC)

pb- pares de bases

PBS- *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

Rpm - rotações por minuto

TBE – Tris-Borato-EDTA

UNL – Universidade Nova de Lisboa

WB – *Western Blot*

WHO- *World Health Organization*

1. Introdução

1.1 Justificação do tema e objetivos

A Borreliose de Lyme (BL) é uma doença multissistémica causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmitidas por vetores do género *Ixodes*, com distribuição mundial (Mannelli *et al.*, 2011).

Em Portugal, a BL é uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO) em humanos, desde 1999, mas tal não acontece para os animais; na União Europeia, apenas na Eslovénia, a BL é uma DDO em animais (Mannelli *et al.*, 2012).

Esta doença é muitas vezes subdiagnosticada e subnotificada devido, principalmente, à falta de conhecimento dos médicos e veterinários e, também, ao facto dos sintomas serem muitas vezes comuns a outras patologias.

A BL é atualmente a doença, cujos agentes são transmitidos por vetores, mais prevalente da Europa (WHO and ECDC, 2016). É uma doença zoonótica, que afeta diversos hospedeiros animais, domésticos e silváticos e também os humanos, sendo estes hospedeiros acidentais (CFSPH, 2011).

Os cães e os cavalos são igualmente hospedeiros acidentais importantes no ciclo de manutenção das espiroquetas na natureza, uma vez que estão expostos aos vetores que transmitem *Borrelia*. Por outro lado, estes animais desempenham um papel importante no ciclo de transmissão ao Homem, pela sua proximidade, uma vez que partilham os mesmos locais e mantêm, assim, por perto o agente patogénico. Por conseguinte, o conceito de “Uma Só Saúde” ou *One Health* revela-se cada vez mais importante, uma vez que tudo se encontra interligado (Saúde Pública, Saúde Animal e Saúde Ambiental). Sabe-se também que, atualmente, devido às alterações climáticas e outros fatores, os vetores frequentam novos habitats o que pode levar à expansão geográfica, não apenas do vetor, mas também do agente em estudo. Por este motivo, poderemos ter novos casos/focos de infeção e de transmissão entre os diferentes hospedeiros e o Homem.

Nesta medida, é importante (re) conhecer o papel que os animais domésticos, como os cães e os cavalos, têm na epidemiologia da doença e o papel que estes têm na possível transmissão do agente patogénico aos humanos. Deste modo, o objetivo principal do trabalho foi caracterizar ao nível serológico e molecular duas populações animais, cães e cavalos, de modo a contribuir para um melhor conhecimento da BL nesses animais.

Para executar o objetivo principal desta dissertação foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a seropositividade da borreliose de Lyme em animais, particularmente em cães e cavalos;
- Avaliar a presença de *Borrelia burgdorferi* sensu lato em amostras biológicas de animais e identificar as genoespécies circulantes por técnicas moleculares sensíveis e específicas.

1.2 Enquadramento histórico da Borreliose de Lyme

A Borreliose de Lyme ou “doença de Lyme”, como inicialmente ficou conhecida, foi descrita pela primeira vez em 1977 (Steere *et al.*, 1977), na sequência de um surto de artrite reumatóide que apresentava outros sinais clínicos invulgares associados, e que atingiu várias crianças residentes na cidade de Lyme em Connecticut, Estados Unidos da América (EUA) (Figura 1). A doença foi associada a carraças de veados, pois a maioria dos doentes inicialmente diagnosticados com artrite reumatóide viviam em zonas de floresta, e os primeiros sinais da doença apareceram no Verão, quando ocorre o maior pico de atividade por parte destes artrópodes (NIAID, 2008; Borchers *et al.*, 2014).



Figura 1. Mapa-mundo com a indicação da localização da cidade de Lyme [Adaptado de: https://www.google.pt/search?noj=1&tbm=isch&q=mapa+mundo+em+branco&sa=X&ved=0ahUKEwi0_pOSszPAhWB7hoKHQt3Bp0QhyYIJQ#imgrc=9QNzpJykeGFjYM%3].

Em 1981, o Dr. Willy Burgdorfer e os seus colaboradores isolaram, pela primeira vez, o agente etiológico da Borreliose de Lyme (BL), a partir de carraças da espécie *Ixodes dammini*, atualmente classificada como *Ixodes scapularis* (NIAID, 2008; Rudenko *et al.*, 2011). Em 1983, este agente foi isolado pela primeira vez na Europa, Suíça, também a partir do vetor, designadamente de carraças da espécie *Ixodes ricinus* (Barbour *et al.*, 1983). No ano seguinte, o agente é designado como *Borrelia burgdorferi*, pelo Prof. Russel Johnson e seus colaboradores, com base em estudos de morfologia, perfis antigénicos e estrutura de DNA (Johnson *et al.*, 1984; Baptista, 2006).

Em 1978, a doença foi descrita pela primeira vez em cavalos na África do Sul associada a *B. theileri* (Cohen *et al.*, 1988), e em 1984 foi descrito o primeiro caso clínico de BL em cães nos Estados Unidos (Lissman *et al.*, 1984).

Em 1989, o primeiro caso clínico de BL em Portugal, foi diagnosticado por David Morais e seus colaboradores, na região de Évora (Collares-Pereira and Franca, 2000). Dez anos mais tarde, a doença passou a ser de declaração obrigatória (DDO) em Portugal. No que respeita aos animais, dentro da União Europeia, a BL é uma doença de notificação obrigatória apenas na Eslovénia (Mannelli *et al.*, 2012).

Em Portugal, em 1993 foi isolada uma nova genoespécie do complexo de *B. burgdorferi* s.l., designada por *Borrelia lusitaniae*, a partir do vetor *Ixodes ricinus* (Núncio *et al.*, 1993). Posteriormente, em 2003, Margarida Collares-Pereira e a sua equipa, obtiveram o primeiro isolado humano de *Borrelia lusitaniae*, a partir de uma biopsia de pele de um doente (Collares-Pereira *et al.*, 2004).

Em 2012, os agentes etiológicos tais como as diversas espécies de *Borrelia*, são incluídos no sistema de informação das zoonoses ao nível da União Europeia (Mannelli *et al.*, 2012).

1.3 O agente etiológico – Espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.

1.3.1 Características gerais

As bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l. são espiroquetas Gram negativas, longas (10 a 30 µm de comprimento), finas (0,2 a 0,5 µm de diâmetro) e de forma espiralada de crescimento lento e fastidioso (Barbour and Hayes, 1986; Stanek and Strle, 2003; Karami 2012). Crescem a uma temperatura ótima de 33 a 35°C em meio de cultura específico *Barbour-Stoenner-Kelly* (BSK), com baixo teor em oxigénio sendo por isso anaeróbias ou microaerofílicas (Singh and Girschick, 2004; EUCALB, 2016). São bactérias extracelulares que no seu ciclo de vida incluem hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Estas bactérias possuem 7 a 14 flagelos periplasmáticos inseridos na membrana externa, e que se cruzam na região central da célula, sendo responsáveis pela motilidade da bactéria, quer nos tecidos do vetor quer nos do hospedeiro. Estes flagelos são constituídos por duas proteínas flagelares, FlaA e FlaB, sendo que, quando esta última é inativada pode observar-se a perda de motilidade da bactéria (Krupka, 2007). Estas duas proteínas são ainda de grande interesse já que é contra elas que se formam os primeiros anticorpos no decurso da doença (Franca, 2000).

O genoma das espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l. tem, aproximadamente, 1.5 Mb, e é constituído por um cromossoma linear e vários plasmídeos lineares e circulares (Figura 2). Por exemplo, a estirpe B31, pertencente à genoespécie *B. burgdorferi* s.s., possui um genoma com um total de 1.515.419 pares de bases (pb), constituído por um cromossoma linear, com 910.725 pb, e por 21 plasmídeos, 12 lineares e 9 circulares, num total de 610.694 pb (Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000). Entre os membros do complexo *B. burgdorferi* s.l. é observada uma grande variabilidade genética, a nível dos plasmídeos, mesmo entre estirpes da mesma genoespécie, mas ao nível do cromossoma, existe elevada homologia genética (Tsao, 2009).

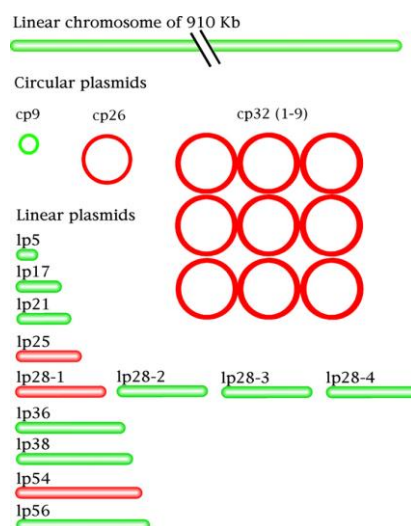


Figura 2. Imagem ilustrativa do genoma segmentado das bactérias do complexo de *B. burgdorferi* s.l. [Extraído de Steward *et al.*, 2005].

O cromossoma linear é constituído, essencialmente por genes que codificam proteínas que estão na origem de diversas funções vitais da bactéria, enquanto nos plasmídeos se localizam a maioria dos genes responsáveis pela patogenicidade tais como, por exemplo, os que codificam as proteínas da membrana externa [*Outer surface proteins* (Osp)], que são as lipoproteínas de superfície, importantes na interação bactéria-vetor-hospedeiro (Fraser *et al.*, 1997; Singh and Girschick, 2004; Karami, 2012). A formação de anticorpos contra este tipo de proteínas só acontece numa fase mais tardia da doença e de forma irregular (Franca, 2000).

As Osp, têm uma grande variabilidade dentro do complexo de *B. burgdorferi* s.l. e são responsáveis pela ativação de várias células dos hospedeiros durante a evasão da bactéria ao sistema imunitário dos mesmos (Casjens *et al.*, 2000). A OspA e OspC são as duas principais lipoproteínas de superfície, sendo utilizadas como alvo de investigação para potenciais vacinas (Van Dam, 2002). Estas duas proteínas e a lipoproteína *Variable major protein like sequence E* (VlsE) são essenciais também no processo de infeção. A OspA é codificada pelo gene do mesmo nome *ospA* quando esta se expressa durante a colonização da bactéria no intestino médio do vetor, sendo a sua expressão reduzida quando o vetor realiza a refeição sanguínea no hospedeiro. Esta refeição induz, por sua vez, a OspC, que está associada às primeiras fases de infeção, facilitando a migração das bactérias do intestino para as glândulas salivares, e sendo reduzida a sua presença quando há necessidade da bactéria permanecer no hospedeiro, cabendo essa função à VlsE que é expressa nessa fase (Figura 3) (Bankhead and Chaconas, 2007; Tilly *et al.*, 2008; Wagner and Erb, 2012).

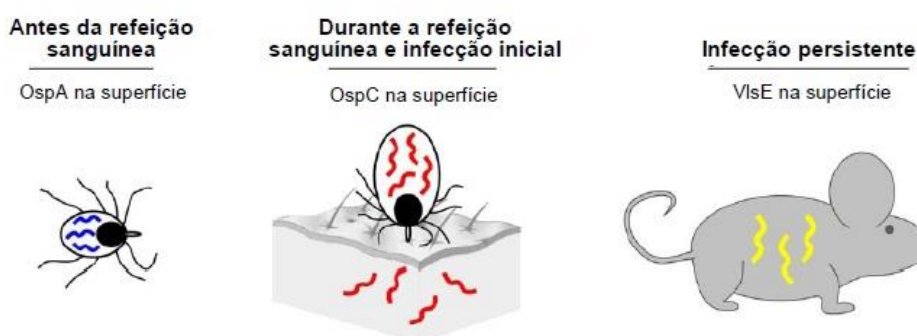


Figura 3. Expressão dos diferentes genes *ospA*, *ospC* e *VlsE*, que codificam as respetivas proteínas com o mesmo nome, durante o desenvolvimento da infeção [Adaptado de Tilly *et al.*, 2008].

Existem ainda outros genes envolvidos no processo de infecção e persistência da bactéria, entre os quais o que codifica a proteína p18 (*Decorin binding protein A*, DbpA), que se liga à matriz extracelular do hospedeiro, permitindo que as espiroquetas migrem para os tecidos e que persistam, por exemplo, nas articulações (Guo *et al.* 1998).

1.3.2 Classificação taxonómica

As espiroquetas que integram o complexo *B. burgdorferi* s.l. pertencem à ordem Spirochaetales, segundo proposta baseada na análise das sequências do gene ribossomal 16S (EUCALB, 2016). Esta ordem inclui três famílias de grande importância: Brachyspiraceae, Leptospiraceae e Spirochaetaceae. É nesta última que se inclui o género *Borrelia*, do qual fazem parte os agentes da Borreliose de Lyme (complexo *B. burgdorferi* s.l.), os agentes da febre recorrente e as borrelíias associadas aos répteis (Mannelli *et al.*, 2012; Franke *et al.*, 2013).

Atualmente fazem parte do complexo *B. burgdorferi* s.l., 20 genoespécies, cinco das quais têm carácter patogénico universalmente assumido para os humanos, designadamente *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* e *B. spielmanii* (Tabela 1) (EUCALB, 2016). Outras genoespécies, entre as quais *B. bissettii*, *B. lusitaniae* e *B. valaisiana*, foram também detetadas em doentes, todavia a patogenicidade destas espécies não está ainda totalmente esclarecida (Stanek *et al.*, 2012; EUCALB, 2016).

Tabela 1: Genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l.. As espécies reconhecidas como patogénicas para os humanos estão apresentadas a negrito [Extraído de: <http://www.eucalb.com/>].

Genoespécie	Distribuição geográfica	Referência
<i>B. afzelii</i>	Europa	Canica <i>et al.</i> , 1993
<i>B. americana</i>	EUA	Rudenko <i>et al.</i> , 2009
<i>B. andersonii</i>	EUA	Marconi <i>et al.</i> , 1995
<i>B. bavariensis</i>	Europa	Magos <i>et al.</i> , 2009
<i>B. bissettii</i>	Europa, EUA	Postic <i>et al.</i> , 1998
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Europa, EUA	Baranton <i>et al.</i> , 1992
<i>B. californiensis</i>	EUA	Postic <i>et al.</i> , 2007
<i>B. carolinensis</i>	EUA	Rudenko <i>et al.</i> , 2009
<i>B. chilensis</i>	América do Sul	Ivanova <i>et al.</i> , 2013
<i>B. finlandensis</i>	Finlândia	Casjens <i>et al.</i> , 2011
<i>B. garinii</i>	Ásia, Europa	Baranton <i>et al.</i> , 1992
<i>B. kurtenbachii</i>	EUA	Margos <i>et al.</i> , 2010
<i>B. lusitaniae</i>	Europa	LeFleche <i>et al.</i> , 1997 Collares Pereira <i>et al.</i> , 2004
<i>B. japonica</i>	Japão	Kawabata <i>et al.</i> , 1993
<i>B. sinica</i>	China	Masuzawa <i>et al.</i> , 2001
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Richter <i>et al.</i> , 2006
<i>B. tanukii</i>	Japão	Fukunaga <i>et al.</i> , 1996
<i>B. turdi</i>	Japão	Fukunaga <i>et al.</i> , 1996
<i>B. valaisiana</i>	Ásia, Europa	Wang <i>et al.</i> , 1997
<i>B. yangtze</i>	China	Chu <i>et al.</i> , 2008

1.3.3 Distribuição geográfica

A distribuição geográfica do complexo *B. burgdorferi* s.l. é ampla na Europa e encontra-se atualmente em expansão (Figura 4). A distribuição destes agentes é concordante com a distribuição geográfica quer dos seus principais vetores, *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus*, quer dos seus hospedeiros reservatórios, fundamentais para a transmissão e manutenção das espiroquetas (Mannelli *et al.*, 2011, Margos *et al.*, 2011).

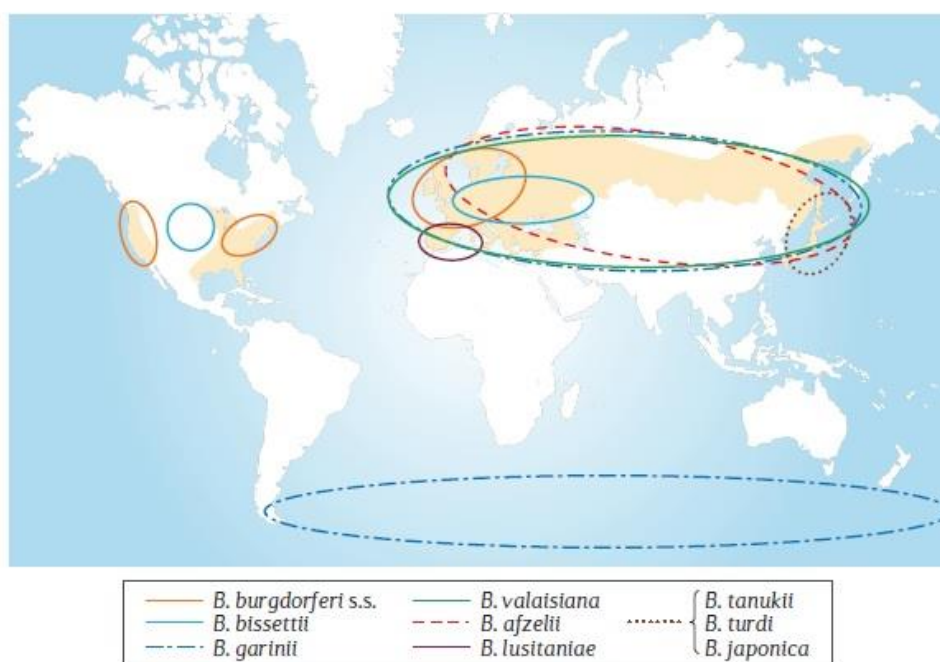


Figura 4. Distribuição geográfica das genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. [Extraído de Kurtenbach *et al.*, 2006].

Na Europa existem várias genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. reconhecidas por causar BL, enquanto na América do Norte apenas *B. burgdorferi* s.s. é reconhecida como patogénica. Este facto, segundo alguns autores, pode indicar que as espécies europeias possuem uma maior diversidade genética em comparação às espécies americanas, e que as espiroquetas responsáveis pela BL tenham surgido no continente europeu (Lopes, 2013). Por outro lado, estudos evidenciaram que existe uma maior relação de proximidade entre as espécies europeias, do que a existente nas espécies da América do Norte, o que sugere que *B. burgdorferi* s.l. deverá ter sido introduzida na Europa a partir do continente americano (Stanek and Reiter, 2011).

A distribuição das diversas genoespécies varia dentro da Europa, sendo que *B. burgdorferi* s.s. é muito comum na Europa Ocidental e *B. lusitaniae* é mais comum no Sul da Europa e na zona mediterrânea (Mannelli *et al.* 2012).

Em Portugal, a genoespécie mais prevalente no vetor é *B. lusitaniae*, mas outras genoespécies, tais como *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* e *B. turdi* foram também já detetadas (Núncio and Lopes de Carvalho, 2014).

1.4 Aspetos epidemiológicos

A BL é a doença causada por agente transmitido por vetores mais prevalente nas zonas temperadas do Hemisfério norte (Lindgren and Jaenson, 2006), sendo que é sobretudo nos EUA e Europa que ocorre o maior número de casos confirmados de BL e apenas alguns têm origem na Ásia ou em África (Borchers *et al.*, 2014).

A incidência anual da doença na Europa aumentou drasticamente nos últimos 20 anos (WHO and ECDC, 2016), sendo reportados anualmente cerca de 85.000 casos, no entanto, este número é subestimado devido à ausência de reconhecimento desta infeção e dos poucos casos reportados (Lindgren and Jaenson, 2006). Os valores de incidência anual variam entre os países; em Portugal e Itália são menos de 1 caso/100.000 habitantes (Lopes de Carvalho and Núncio, 2006), enquanto noutros países como Áustria e Eslovénia há indicação de mais de 100 casos/100.000 habitantes (WHO and ECDC, 2016).

Ao contrário da situação existente no nosso país desde 1999, na maioria dos países da Europa, com exceção também da Croácia, República Checa, Estónia, Itália, Lituânia, Letónia e Eslovénia (Hubálek, 2009), a BL não é uma doença de declaração obrigatória (DDO) nos humanos. Esta é endémica em várias regiões da Europa, apresentando elevadas incidências de casos reportados na Suécia, Lituânia, Áustria e Eslovénia (Borchers *et al.*, 2014).

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos epidemiológicos, em várias regiões, tendo-se verificado que a prevalência desta doença varia geograficamente (Littman *et al.* 2006).

Estudos de seroprevalência realizados nos EUA em populações caninas de vários estados norte americanos mostraram resultados muito diferentes, com seroprevalências a variar entre os 8% no estado de Michigan e os 53% no estado de Wisconsin (Guerra *et al.*, 2001). Estudos serológicos realizados em Espanha apresentam valores de seroprevalência entre os 0,6% (Solano-Gallego *et al.*, 2006) e os 11,6% (Merino *et al.*, 2000), enquanto os estudos realizados em Portugal indicam valores que variavam entre os 0,2 % (Cardoso *et al.*, 2012) e os 12,7% (Figueiredo, 2007). Na Ásia, foi também descrita a presença de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi*, no Japão (Uesaka *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao agente etiológico, no nosso país, foi descrita uma taxa de infeção da ordem de 0,8% numa população de cães a sul de Portugal (Maia *et al.*, 2015). A presença do agente foi também já descrita em cães de outras regiões da Europa, como a Polónia (Skotarczak and Wodecka, 2005) e Reino Unido (Shaw *et al.*, 2005), com taxas de infeção de 16,3% e 0,04%, respetivamente.

A deteção de anticorpos nas populações equinas foi descrita, pela primeira vez, em 1984 nos EUA, na região de Massachusetts, tendo sido encontrados valores de seroprevalência de 24% para cavalos oriundos de zonas endémicas, e de 1% para cavalos provenientes de zonas não endémicas (Cohen *et al.*, 1988). Noutro estudo, realizado no Minnesota, também nos EUA, foi encontrada uma seroprevalência de 58,7% (Durrani *et al.*, 2011). Na Europa, em regiões como Itália (Ebani *et al.*, 2012), Polónia (Štefančíková, *et al.*, 2008), Dinamarca (Hansen *et al.*, 2010) e Áustria (Butler *et al.*, 2016), já foi descrita a presença de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi*, com valores de seroprevalência de 24,3%, 25,6%, 33,3% e 45%, respetivamente. Por métodos moleculares, a presença de *B. lusitaniae* foi já descrita em Itália com uma taxa de infeção de 5,1% (Veronesi *et al.*, 2012). Em Portugal, no entanto, e até à data não existe, pelo menos que seja do nosso conhecimento, nenhum estudo de seroprevalência da doença e/ou de deteção de DNA do agente em cavalos.

1.5 Vetores ixodídeos do género *Ixodes*

Como já foi anteriormente referido, as espiroquetas que causam BL são transmitidas por carraças do género *Ixodes*, que asseguram não só a manutenção do agente patogénico na natureza, como a transmissão do mesmo para os hospedeiros suscetíveis, assumindo assim o papel de hospedeiro invertebrado. Na Europa, a espécie *Ixodes ricinus* é o principal vetor da BL (Figura 5). Este vetor está envolvido também no ciclo de transmissão de outros agentes patogénicos, entre os quais as bactérias da espécie *Anaplasma phagocytophilum* e algumas espécies de *Rickettsia*, podendo transmiti-los aos humanos, animais domésticos e silváticos (Parola and Raoult, 2001; ECDC, 2016b).

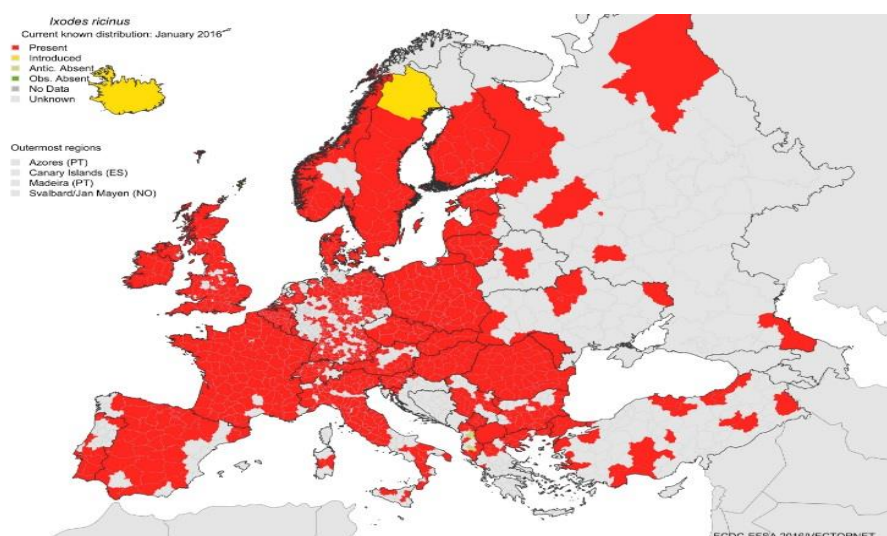


Figura 5. Distribuição da espécie *Ixodes ricinus* na Europa, janeiro 2016 [Extraído de: ECDC, 2016c].

Em Portugal, o vetor apresenta uma distribuição heterogénea, mas é encontrado de norte a sul do país, sendo mais predominante em zonas com maior cobertura vegetal e com humidade relativa mais elevada (Figura 6). Nos últimos anos, tem sido observada a expansão geográfica do vetor quer em latitude quer em altitude, devido principalmente às alterações climáticas, o que leva o vetor a colonizar novos habitats (Santos-Silva *et al.*, 2011).

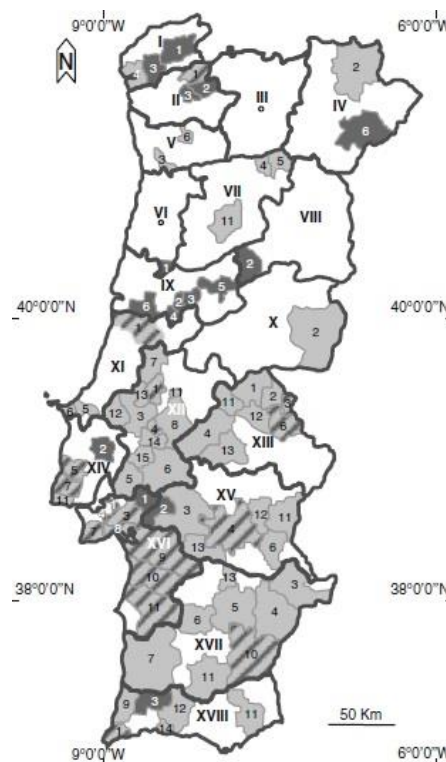


Figura 6. Distribuição geográfica da espécie *Ixodes ricinus* em Portugal Continental. Áreas cinzentas simbolizam áreas onde o vetor foi identificado em estudos anteriores a 1994; as áreas a negro, correspondem aos locais onde por estudos recentes, foram produzidos novos dados, e as áreas sublinhadas são aquelas onde o vetor já foi identificado (quer em estudos mais antigos, quer recentes) (Santos-Silva *et al.*, 2011).

O ciclo de vida do vetor compreende quatro (4) fases distintas: uma inativa – ovo; e três ativas - larva, ninfa e adulto. Este ciclo de vida tem uma duração variável, dependendo não só da disponibilidade de hospedeiros como também das condições climáticas, podendo demorar três anos para ser completado em regiões com climas mais frios (Franca, 2000). Este é um ciclo trifásico, pois cada estágio ativo realiza uma refeição sanguínea num hospedeiro e após esta, o vetor solta-se do hospedeiro e, no solo, sofre metamorfose para o estágio seguinte. No caso das fêmeas adultas, quando estas se soltam do hospedeiro fazem a ovoposição, podendo a mesma, conter cerca de 2000 ovos (Figura 7) (Stanek *et al.*, 2012).

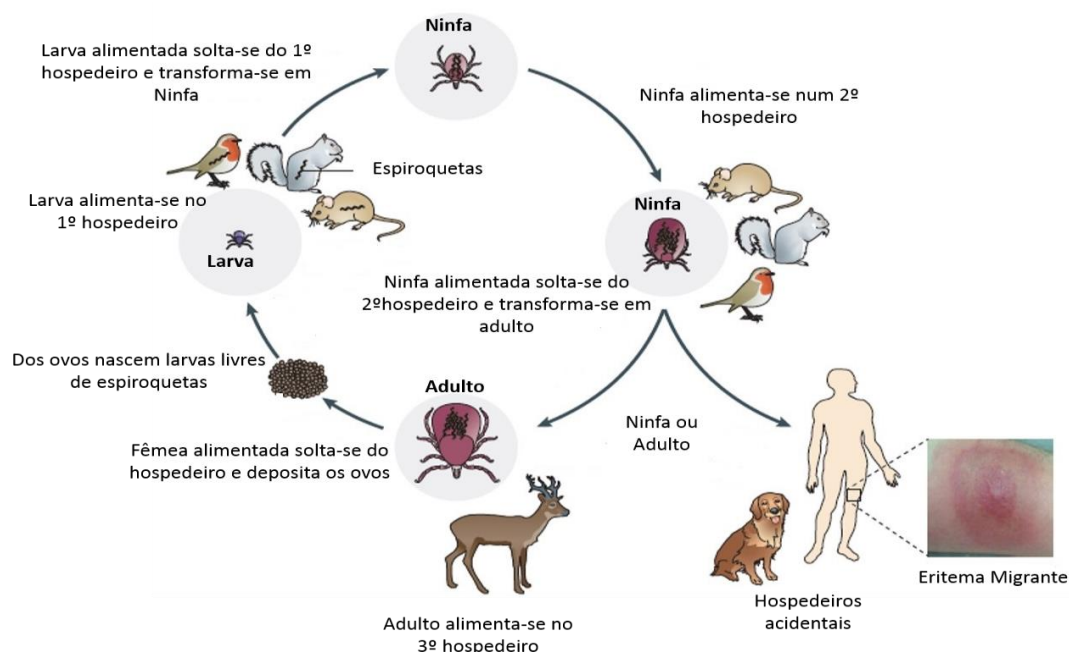


Figura 7. Ciclo zoonótico do vetor *Ixodes ricinus* [Adaptado de Radolf *et al.*, 2012].

Os vetores de BL, e em concreto a espécie *I. ricinus*, localizam o hospedeiro vertebrado através de células epiteliais fotossensíveis e quimiorrecetoras que captam vibrações, calor e odores do possível hospedeiro (Marta, 2009). A fixação ao hospedeiro é feita através das peças bucais, que provocam uma lesão no local. Consoante a genoespécie envolvente, a refeição sanguínea terá de durar, entre 12 a 48 horas, para que a transmissão de espiroquetas seja feita com sucesso, uma vez que é durante este período que as borrélias do complexo *B. burgdorferi* s.l. se multiplicam e atravessam o epitélio intestinal para a hemolinfa, disseminando-se para as glândulas salivares, infectando posteriormente o hospedeiro através da inoculação da saliva. As glândulas salivares do vetor possuem substâncias anticoagulantes e analgésicas, a par de outros componentes que suprimem a ação do sistema imunitário do hospedeiro, impedindo a morte das espiroquetas durante o ciclo de transmissão (Kuthejlová *et al.*, 2001). Em seguida, as espiroquetas disseminam-se do local de mordedura para outros locais, podendo atingir diversos órgãos e tecidos (Stanek *et al.*, 2012).

1.6 Hospedeiros vertebrados

O vetor *I. ricinus* alimenta-se em mais de 300 espécies de vertebrados distribuídos entre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e, ocasionalmente, humanos (Mannelli *et al.*, 2012; Nuncio and Lopes de Carvalho, 2014). Apesar da grande variedade de espécies das quais o vetor se alimenta, apenas algumas parecem ter um papel importante na transmissão e manutenção das espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l., comportando-se como hospedeiros reservatórios (Faria, 2015). Estes são persistente e assintomaticamente infetados pelas borrélias, mantendo uma concentração elevada das referidas bactérias na corrente sanguínea ao longo do tempo, e constituindo, por isso, fonte de infeção para os vetores que neles se alimentem (Radolf *et al.*, 2012). Espécies como *Turdus merula*, *Lacerta viridis* e *Apodemus sylvaticus* são hospedeiros reservatórios que permitem a manutenção das borrélias na natureza (Figura 8) (Mannelli *et al.*, 2012).



Figura 8. Exemplos de hospedeiros reservatórios de *B. burgdorferi* s.l. A- *Turdus merula* (Melro-preto); B- *Lacerta viridis* (Lagarto-verde europeu) C- *Apodemus sylvaticus* (rato-do-campo) [Extraído de: A- <http://www.veterinaria-atual.pt/estudo-de-transmissao-de-doencas-infecciosas-por-aves/>; B-<http://www.bpo-natura.de/en/index.php?id=124>; C-<http://www.biodiversidadvirtual.org/mamiferos/Apodemus-sylvaticus-img4028.html>].

Embora exista alguma especificidade entre a genoespécie e o hospedeiro reservatório, esta não é absoluta (Mannelli *et al.*, 2012). Normalmente, *B. garinii* e *B. valaisiana* encontram-se associadas a aves, que facilitam o transporte dos ixodídeos e a transmissão das borrélias para longas distâncias, enquanto *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s.s. se encontram associadas a pequenos roedores. Por outro lado, a espécie *B. lusitaniae* parece ser sobretudo mantida em lagartos (Lopes de Carvalho, 2010; Norte *et al.*, 2015). Outras espécies animais, entre as quais o Homem, os cães domésticos, os cavalos e outros

ungulados, são apenas considerados hospedeiros acidentais (*dead-end hosts*), uma vez que são suscetíveis ao agente e alimentam o vetor, sendo importantes para a manutenção do agente na natureza, mas o seu papel na transmissão do agente aos vetores, ao ambiente e a outros animais é ainda pouco conhecido (Figura 9) (Mannelli *et al.*, 2012).

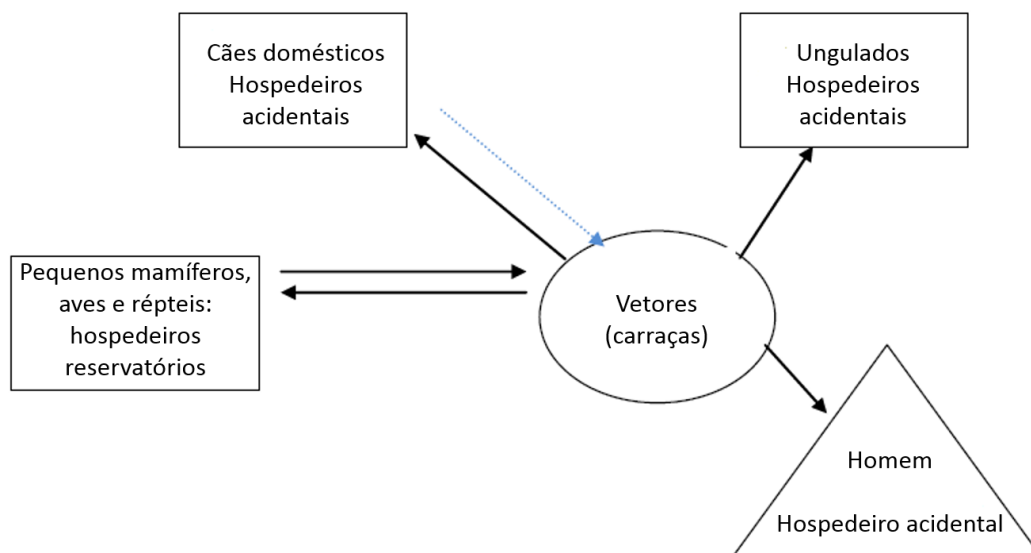


Figura 9. Diagrama de transmissão de *B. burgdorferi* s.l. entre hospedeiros e vetores [Adaptado de Mannelli, *et al.*, 2012.].

Os cães são os animais domésticos que mais parecem desenvolver a doença (Chomel, 2015). Estes são hospedeiros competentes por um período curto, mas que desenvolvem rapidamente imunidade contra os agentes da *B. burgdorferi* s.l. (EUCALB, 2016). Alguns programas de vigilância de BL, consideram os cães como “sentinela” para a BL em humanos, devido à sua proximidade com os humanos, muitas vezes de coabitação, reconhecendo que podem ser possíveis indicadores dos agentes patogénicos a que os humanos estão exposto (Reif, 2011; Baum *et al.*, 2014). As genoespécies que frequentemente parecem estar mais associadas a infeção nestes animais são *B. afzelii* e *B. garinii* (Mannelli *et al.*, 2012).

O papel dos ungulados tem sido, em geral, negligenciado devido à dificuldade de avaliação do seu papel na manutenção e transmissão do agente de BL na natureza (Faria, 2015). Os ungulados apresentam uma distribuição ampla, a nível europeu, e parecem estar envolvidos indiretamente na dispersão e manutenção do agente de BL,

visto que proporcionam uma alimentação sanguínea às carrças infetadas e não-infetadas. Atualmente existe ainda pouca informação acerca do papel que estes animais têm no ciclo de transmissão (Ruiz-Fons *et al.*, 2006; Faria, 2015).

Os ungulados, tais como os cavalos, são considerados apenas hospedeiros acidentais. A infeção por *B. burgdorferi* s.l. nestes animais é normalmente assintomática, sendo que a genoespécie mais frequentemente associada a infeção nestes animais é *B. afzelii* (Butler *et al.*, 2005).

1.7 Manifestações clínicas

A BL é uma doença multissistémica que atinge vários órgãos e sistemas, tais como a pele, o coração, o sistema músculo-esquelético e o sistema nervoso (WHO and ECDC, 2016), pelo que exibe um vasto leque de sinais clínicos, em geral, comuns a outras doenças. A manifestação clínica mais frequente, e característica da BL em humanos, é o Eritema Migrante (EM), erupção vermelha no local de mordedura da carrça que se expande perifericamente, no entanto esta é uma condição rara nos animais (Chomel, 2015).

Os sinais clínicos da BL podem ser distintos, consoante a genoespécie de *Borrelia* a que está associada a infeção. As manifestações na pele, designadamente o EM, estão habitualmente associadas à infeção por *B. afzelii*, enquanto as lesões neurológicas estão associadas à espécie *B. garinii*, e os problemas nas articulações, tal como a artrite de Lyme, encontram-se geralmente relacionadas com a genoespécie *B. burgdorferi* s.s. (Veinović *et al.*, 2013; EUALB, 2016). Por outro lado, os sinais clínicos podem também variar consoante a área geográfica, devido às diversas genoespécies patogénicas encontradas nessa área (CFSPH, 2011).

Nos animais a doença é normalmente assintomática, mas quando presentes os sinais clínicos são comuns a várias outras doenças, pelo que o quadro clínico não é específico, sendo por isso importante recorrer-se a testes serológicos e/ou moleculares para deteção de títulos de anticorpos para *B. burgdorferi* s.l. e/ou da presença do microrganismo no vetor e hospedeiro (Bushmich, 1994; CFSPH, 2011).

1.7.1 Humanos

A doença é caracterizada por apresentar três estádios. O primeiro estágio da doença aparece nas primeiras semanas de infecção e caracteriza-se, maioritariamente, pelo aparecimento de uma lesão na pele, no local da mordedura (Figura 10). Esta lesão é normalmente indolor, mas pode vir acompanhada de outros sintomas, tais como febre, fadiga, mal-estar, mialgias, e pode permanecer durante dias ou semanas após a mordedura. Este tipo de lesão pode resolver-se, sem recorrer a nenhum tipo de tratamento, no entanto, a infecção pode evoluir e ocorrer a disseminação das espiroquetas a outros órgãos e sistemas (Fritz and Kjemtrup, 2003). Esta invasão irá originar novos sinais clínicos e a necessidade de tratamento, de modo a impedir a progressão da doença para novos estádios.



Figura 10. Imagem ilustrativa de Eritema Migrante [*Extraído de:* WHO and ECDC, 2016].

Semanas a meses mais tarde, a doença avança para o segundo estágio, com o desenvolvimento de outros sintomas, tal como artrites (Artrite de Lyme), problemas cardíacos, tal como arritmias e miocardites (cardite de Lyme), problemas neurológicos, entre as quais a meningite, paralisias faciais e radiculites e, em casos mais raros, problemas de visão como, por exemplo, conjuntivite, neurite ótica e atrofia do nervo ótico, entre outros (CFSPH, 2011).

O terceiro, e último, estágio da doença, aparece após alguns meses ou anos. Este estágio corresponde à fase crónica da doença e caracteriza-se pelo aparecimento de

manifestações clínicas mais graves, tal como a acrodermatite atrófica crónica (ACA) e de complicações neurológicas, tal como a meningoencefalite progressiva, paralisia de Bell, entre outras.

1.7.2 Cães

A infeção por *B. burgdorferi* s.l. nestes animais apresenta uma taxa elevada, cerca de 25 a 90%, em zonas endémicas e em zonas onde a presença do vetor é constante (Fritz and Kjemtrup, 2003), no entanto, apenas 5% dos cães infetados desenvolvem sinais clínicos (Bushmich, 1994; Mannelli *et al.*, 2012). Os sinais clínicos são inespecíficos e muitas vezes são confundidos com os de outras doenças. Estes podem surgir cerca de dois a cinco meses após a infeção (Fritz and Kjemtrup, 2003; Littman *et al.*, 2006).

Os sinais clínicos mais comuns são edema nas articulações, que pode levar a processos de claudicação aguda ou intermitente, frequentemente acompanhados de febre e anorexia (Bushmich, 1994; Littman, 2003). Este processo de claudicação é normalmente resolvido espontaneamente em quatro dias, mas num terço dos animais este processo volta a aparecer noutro tipo de articulação (Figueiredo, 2007). As articulações mais afetadas são o tarso e o carpo, sendo que, por vezes, ambas as articulações são afetadas (Fritz and Kjemtrup, 2003).

Embora menos frequentes, existem ainda sinais clínicos associados à disseminação das espiroquetas para outros órgãos, entre os quais coração, rins e fígado, tais como miocardite e falha renal. Outro tipo de sintomas podem desenvolver-se a nível neurológico, como mudanças de comportamento (Bhide *et al.*, 2004; Chomel, 2015; EUCALB, 2016).

A nível dermatológico, apenas uma pequena lesão compatível com o eritema, desenvolvida no local de fixação do ixodídeo, foi descrita até ao momento (Littman *et al.*, 2006).

Inicialmente, apenas *B. burgdorferi* s.s. foi encontrada associada à BL em cães, mas estudos recentes indicam também *B. afzelii* e *B. garinii* como agentes responsáveis pela doença nestes animais (Mannelli *et al.*, 2012).

1.7.3 Cavalos

Em zonas endémicas é comum aparecerem animais com níveis de anticorpos detetáveis, estimando-se que nessas regiões os valores de seroprevalência possam ser superiores a 40% (Hansen *et al.*, 2010). Ainda nestas regiões foi, também, descrita a presença de espiroquetas *Borrelia burgdorferi* nos tecidos infetados (Fritz and Kjemtrup, 2003). Por norma, os cavalos não desenvolvem sinais clínicos associados à infeção ou, quando estes surgem, são difíceis de associar devido à inespecificidade dos sintomas (Fritz and Kjemtrup, 2003).

Quando há desenvolvimento de sinais clínicos, estes caracterizam-se maioritariamente por febre, uveíte, artrite, mialgias, perda de peso, lesões de pele, tais como perda de pelo, lesões neurológicas, como mudanças de comportamento, paralisia facial e encefalite, hepatite e aborto (Chang *et al.*, 2000; CFSPH, 2011; Chomel, 2015).

1.8 Diagnóstico clínico

O diagnóstico da BL é, maioritariamente, clínico apesar da maioria das infeções por *B. burgdorferi* s.l. serem assintomáticas, quer em humanos quer em animais. A maior parte dos sinais clínicos são inespecíficos e similares a outras doenças e, por isso, é importante incluir a BL num diagnóstico diferencial. O diagnóstico clínico da BL é baseado na identificação dos principais sintomas da doença, entre os quais o aparecimento do EM, na história clínica do doente (nos humanos) e se houve exposição/mordedura de carraça. Contudo, este diagnóstico pode ser complementado pelos testes laboratoriais adequados à situação de cada doente, através da determinação da presença de anticorpos específicos e/ou deteção de DNA de *Borrelia*.

O diagnóstico laboratorial varia consoante os sinais clínicos que os doentes apresentam (Quadro 1) (Núncio and Lopes de Carvalho, 2014). Por outro lado, os doentes podem estar co-infetados com outros agentes patogénicos, pelo que o diagnóstico laboratorial assume aí, também, um papel importante.

Quadro 1: Evidências clínicas e laboratoriais aconselhadas para validação do diagnóstico de Borreliose de Lyme de acordo com a manifestação clínica (Núncio and Lopes de Carvalho, 2014)

Termo	Evidência laboratorial essencial	Evidência clínica/laboratorial de suporte
Eritema migratório	Nenhuma	Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de biopsia de pele.
Linfocitoma borreliano (raro)	Seroconversão ou serologia positiva; histologia nos casos suspeitos	Histologia. Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de biopsia de pele. EM recente ou concomitante.
Acrodermatite crónica atrofante	Anticorpos IgG específicos no soro, com concentrações elevadas	Histologia. Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de biopsia de pele
Neuroborreliose de Lyme	Pleocitose e demonstração de síntese intratecal de anticorpos específicos	Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de líquido cefalorraquidiano. Síntese intratecal de anticorpos específicos IgM e/ou IgG e/ou IgA. Anticorpos específicos no soro. EM recente ou concomitante
Artrite de Lyme	Anticorpos IgG específicos no soro, com concentrações elevadas	Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de líquido sinovial e/ou tecido
Cardite de Lyme	Anticorpos específicos no soro	Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de biopsia de tecido do endomiocardio. EM recente ou concomitante e/ou manifestações neurológicas.
Manifestações oculares	Anticorpos específicos no soro	Manifestações de borreliose de Lyme recentes ou concomitantes. Deteção de <i>B. burgdorferi</i> s.l. por isolamento e/ou PCR a partir de líquido ocular.

1.9 Diagnóstico Laboratorial

1.9.1 Cultura e Microscopia

O isolamento de *B. burgdorferi* s.l. em cultura com meio específico (BSK) continua a ser o teste *gold-standard* no diagnóstico laboratorial da BL (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). O isolamento é normalmente difícil de obter visto que as bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l. têm um crescimento lento e fastidioso, cerca de 12 semanas de incubação a uma temperatura de 34°C, sendo que o número destas bactérias presentes em amostras biológicas é, em geral, reduzido (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Por estes

motivos, a técnica apresenta baixas taxas de sucesso, do qual podem resultar falso-negativos, sendo por isso uma técnica pouco utilizada no diagnóstico de rotina (EUCALB, 2016).

No que respeita aos cães, já foi documentado o isolamento de *B. burgdorferi* s.l. a partir de amostras colhidas em cães assintomáticos, mas normalmente as amostras sanguíneas contêm um baixo número de microrganismos durante a fase de disseminação precoce ou tardia (Alexandre, 2005).

A observação direta de *B. burgdorferi* s.l. em cortes histológicos, por exemplo, requer a utilização de métodos de coloração específica (ex: coloração pela prata) pois, devido às suas características morfológicas, as borrélias não são visualizadas em microscopia ótica de luz clara, sendo apenas visualizadas em microscopia de fundo escuro.

1.9.2 Diagnóstico serológico

O diagnóstico serológico é o mais utilizado na rotina laboratorial para pesquisa de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. no soro ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) de humanos e animais com suspeita de BL. Os testes frequentemente utilizados são a técnica de imunofluorescência indireta (IFA), Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e o teste de *Western Blot* (WB).

Diversas instituições internacionais, entre as quais o ECDC (*European Center for Disease Control and Prevention*), a WHO (*World Health Organization*) e ainda a EUCALB (*European Union Concerted Action on Lyme Disease*) recomendam uma abordagem “two-steps” para a pesquisa de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. Na abordagem inicial, as amostras biológicas são testadas recorrendo-se a testes de rastreio, designadamente ELISA ou IFA, que são sensíveis, mas pouco específicos. Se estes testes revelarem resultados negativos, considera-se a amostra negativa, se forem positivos ou duvidosos é realizado um segundo teste, que é um teste confirmatório, normalmente *Western Blot* (WB). O teste de WB é um teste mais sensível e específico em comparação com os testes de rastreio.

Geralmente, apenas as amostras que apresentam resultados positivos para ambos os testes são consideradas positivas (Figura 11).

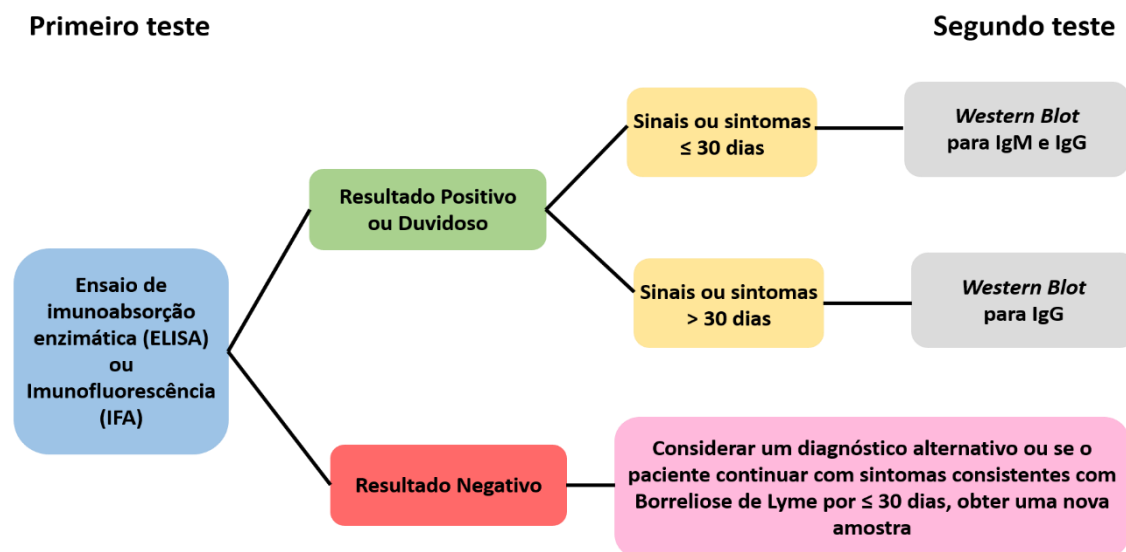


Figura 11. Abordagem “two-steps” recomendado por Organizações Internacionais [Adaptado de CDC].

Os testes serológicos possuem, contudo, algumas limitações. Por exemplo durante as primeiras semanas de infecção, há uma resposta imune reduzida ou ausente, o que poderá levar à obtenção de resultados falso-negativos. Por outro lado, também nestes testes há a possibilidade de ocorrerem falso-positivos devido a possíveis reações cruzadas com outro tipo de agentes patogénicos, tais como, por exemplo, outras espiroquetas dos géneros *Treponema* spp. e *Leptospira* spp. entre outros agentes bacterianos e virais (Johnson, 2011). Também a vacinação em cães, que induz a produção de anticorpos, pode condicionar o resultado do teste, resultando em falso-positivos (Mannelli *et al.*, 2012). Outra das limitações é a falta de padronização para o limite de positividade em amostras animais, sendo que este, por exemplo na IFA, varia consoante os autores (Durrani *et al.*, 2011; Ebani *et al.*, 2012).

O teste de IFA pode ser substituído por outros métodos serológicos mais práticos e sensíveis, como os testes ELISA. Os kits atualmente disponíveis no mercado utilizam antígenos recombinantes, tais como p39 ou péptidos sintéticos (IR6 ou C6). O péptido C6, que deriva do antígeno VlsE, é expresso durante a infecção, mas não em casos de

vacinação, o que diminui as reatividades derivadas das reações cruzadas e indica exposição natural do animal (Littman *et al.*, 2006).

Na medicina veterinária estão disponíveis testes rápidos, tais como os testes SNAP® 3Dx ou 4Dx (IDEXX®), que podem ser incluídos na rotina das clínicas veterinárias e que também podem trazer vantagem ao serem utilizados como testes de rastreio em cães assintomáticos, uma vez que permitem fazer o rastreio de diversas infecções transmitidas por carrapatos, incluindo a infecção por borrelíias do complexo *B. burgdorferi* s.l. (Goldstein, 2010).

Nos cães, são detetados títulos positivos de anticorpos, a partir das 4-6 semanas após a infecção, atingindo níveis máximos entre os 90 e os 120 dias após a infecção se não forem sujeitos a terapêutica estes níveis podem permanecer até aos 22 meses (Fritz and Kjemtrup, 2003). Nestes animais não é aconselhável realizar testes para IgM e IgG em simultâneo, uma vez que as IgM estão presentes numa fase inicial da doença, quando ainda não se desenvolveu qualquer sinal clínico, ao passo que as IgG surgem depois da presença destes (Littman, 2003; Littman *et al.*, 2006).

Nos cavalos, mesmo não havendo desenvolvimento de sinais clínicos, os anticorpos são normalmente detetados cinco a seis semanas após a infecção, podendo permanecer detetáveis durante dois anos (Mannelli *et al.*, 2012).

Os testes de WB, que são bastantes dispendiosos, são utilizados para confirmação dos testes positivos ou duvidosos, obtidos por IFA ou ELISA (Fritz and Kjemtrup, 2003). O teste de WB consiste na reação anticorpo-antígeno que ocorre entre os anticorpos desenvolvidos pelo animal e os antígenos recombinantes impregnados nas tiras de nitrocelulose. Alguns desses antígenos são específicos para determinadas características, sendo que uma exposição natural por *B. burgdorferi* s.l. caracteriza-se pelo aparecimento de antígenos como os que são materializados pelas frações proteicas p39 e p23, enquanto num cão vacinado há reatividades contra a OspA.

Importa referir que cada fabricante dos kits comerciais, atualmente disponíveis no mercado, apresenta painéis de antígenos (frações proteicas) distintas, sendo que se deve obrigatoriamente seguir o procedimento e posterior interpretação de acordo com as instruções do fabricante em causa. Acresce que a diversidade de oferta deste tipo de testes

por um lado, e a ausência de padronização dos resultados por outro, são uma das maiores dificuldades observadas aquando da interpretação dos resultados.

1.9.3 Diagnóstico molecular

A técnica de PCR, reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), veio revolucionar o diagnóstico laboratorial, na medida em que permite detetar e identificar uma grande variedade de agentes patogénicos em amostras obtidas de hospedeiros e vetores. Por outro lado, esta técnica consegue detetar um baixo número de cópias do gene em estudo, o que permite aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Todavia, a presença de uma amostra positiva por PCR permite identificar a presença de DNA do agente em causa, mas não permite inferir sobre a viabilidade desse agente, nem sobre o estado clínico do sujeito (Mannelli *et al.*, 2012; EUCALB, 2016)

Várias técnicas de PCR, nomeadamente PCR convencional, *nested*-PCR e PCR em tempo real são usadas para a deteção de DNA de *Borrelia*, sendo a *nested*-PCR a mais utilizada. A *nested*-PCR é uma técnica de deteção direta, que envolve duas amplificações sequenciais de DNA e dois pares de *primers* específicos. Esta técnica possui uma elevada sensibilidade quando comparada com a PCR convencional (Mannelli *et al.*, 2012; EUCALB, 2016).

Atualmente, são utilizados vários alvos genómicos para deteção e identificação das espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l., entre os quais o gene *flaB*, que codifica a flagelina e que está localizado no cromossoma da bactéria. Outros alvos genómicos, tais como os genes *osp* (*ospA*, *ospB*, *ospC*) que codificam proteínas de superfície, localizados nos plasmídeos, podem ser também utilizados, mas apresentam uma grande variabilidade, razão pela qual são normalmente pouco utilizados na identificação de *Borrelia* spp. (Wodecka *et al.*, 2010). Existem ainda outros alvos genómicos importantes como os genes que codificam o rRNA de ambas as subunidades ribossomais como o *rrs* e a região intergénica. O *cluster* do gene *rrn* de *B. burgdorferi* s.l. tem especial importância, na medida que é raro, na sequência repetida em *tandem* do rRNA 23S e rRNA 5S, o que o torna importante para a deteção, identificação e tipagem das bactérias do complexo (Schwartz *et al.*, 1992).

Embora não seja utilizada no diagnóstico de BL, a detecção molecular de *Borrelia* spp. é realizada também em amostras extraídas do vetor (designadamente as glândulas salivares), permitindo determinar as taxas de infecção do vetor e identificar potenciais áreas de risco para a saúde pública e animal (Lopes, 2013).

1.10 Tratamento

A escolha do tratamento depende principalmente do estágio e manifestações clínicas da doença no momento do diagnóstico (Hansmann, 2009).

A antibioterapia é o tratamento mais recomendável, sendo a doxiciclina e a amoxiciclina, os antibióticos mais utilizados num tratamento com duração de 30 dias (Chomel, 2015; Littman *et al.*, 2006). A doxiciclina é considerado o antibiótico de primeira linha devido à sua lipossolubilidade e à grande distribuição tecidual. Este antibiótico, que é de baixo custo e também tem propriedades anti-inflamatórias, é o mais utilizado em animais pois é igualmente eficaz contra outros agentes transmitidos por carrapatos, designadamente rickettsias, anaplasmas e ehrlichias, aquando da suspeita de co-infecção (Littman *et al.*, 2006).

Existem alguns casos relatados de BL crónica, desconhecendo-se se é devida ao reaparecimento da infecção, à não eliminação completa do agente e/ou à sua persistência por falha terapêutica ou, ainda, ao não desenvolvimento de imunidade contra *Borrelia burgdorferi* (Littman, 2003).

Outros tipos de medicamentos podem ser administrados, tal como anti-inflamatórios ou anti-convulsivos, para alívio de sinais clínicos, designadamente dor, claudicação, e convulsões (associadas a neuroborreliose). Em casos de nefropatia, os cães podem beneficiar da utilização de adjuvantes terapêuticos como inibidores da enzima de conversão da angiotensina e ácidos gordos ómega-3 (Littman *et al.*, 2006).

1.11 Prevenção

Existem algumas medidas de prevenção que podem ser aplicadas de modo a evitar ou diminuir o contacto com as carrças, tais como o uso de repelentes e o uso de roupas adequadas, ou seja, de cores claras, com mangas comprimidas, e calças por dentro das meias, sendo que estas medidas devem ser aplicadas quando se realizam atividades de campo em trabalho ou lazer (Stanek *et al.*, 2012).

A desparasitação e a vacinação em animais domésticos é um meio importante de prevenção, principalmente em zonas endémicas, visto que ajuda a repelir e a diminuir o tempo de fixação das carrças, mas a sua utilização tem de ser de forma ponderada, visto que 95% dos cães não desenvolve sinais clínicos e, por isso, estas vacinas são normalmente administradas individualmente (Littman *et al.*, 2006; Lopes, 2013).

Na última década do século XX foram desenvolvidas algumas vacinas para BL para canídeos. Atualmente, existem três vacinas para prevenção de BL, duas das quais são bacterinas de *Borrelia burgdorferi* e uma vacina recombinante que contém a subunidade OspA, que pode também ser utilizada em cavalos (Fritz and Kjemtrup, 2003; Divers, 2013). Estas vacinas são administradas inicialmente em duas doses com um intervalo de 3 a 4 semanas, e depois é feito o reforço, anualmente.

Em Portugal, desde o ano passado, existe disponível no mercado a vacina Merilym 3 (MERIAL Portuguesa®). Esta vacina é composta por componentes inativados de três espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* e *B. afzelii*), e deve ser aplicada antes do pico de atividade dos vetores (DGAV, 2013). A Merilym 3 é utilizada nos cães e deve ser aplicada a partir das 12 semanas de idade (2 doses com intervalo de 3 semanas), de modo a induzir uma resposta anti-OspA e, em seguida, deve ser feito o reforço anual, de modo a manter a imunidade (DGAV, 2013).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras biológicas

No presente trabalho foram utilizadas amostras de animais domésticos de duas espécies: cães (*Canis lupus familiaris*) e cavalos (*Equus caballus*), sem quaisquer sinais clínicos compatíveis com BL. Estes animais assintomáticos estão caracterizados epidemiologicamente para outras doenças causadas por agentes transmitidos por vetores, entre as quais anaplasmoze, rickettsiose, babesiose, theileriose e leishmaniose. Essa caracterização permitiu concluir que estes são animais muito expostos aos agentes transmitidos por vetores, entre os quais as carraças, que podem igualmente transmitir os agentes de BL.

Desta forma, as duas populações animais que foram selecionadas são representativas de animais com exposição aos ixodídeos, passíveis de transmitir *B. burgdorferi* s.l., e que vivem em estreita proximidade com os humanos, partilhando com eles os mesmos ambientes.

Foi assim selecionado um total de 240 amostras biológicas, provenientes das referidas populações animais, que foram conservadas a -20°C até serem submetidas a testes serológicos, para pesquisa de anticorpos anti-*B.burgdorferi* s.l.; e a testes moleculares para amplificação e caracterização do DNA de *Borrelia* spp..

2.1.1 Soros de cães

Da população de cães utilizou-se um total de 114 amostras séricas colhidas em 2013, das quais 94 amostras eram de cães militares, assintomáticos, provenientes de diversas bases militares de Portugal Continental e das regiões autónomas da Madeira e Açores, e 20 outras amostras recebidas no Instituto de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) para despiste de Leishmaniose e Babesiose, no âmbito do diagnóstico de rotina.

2.1.2 Soros de cavalos

Da população de cavalos, foi utilizado um total de 126 amostras séricas colhidas em 2010, 2015 e 2016, e recebidas no INIAV para despiste de outros agentes patogénicos nomeadamente, *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

2.2. Cultura de estirpes de referência *Borrelia burgdorferi* s.l.

Foram utilizadas quatro estirpes de referência de *B. burgdorferi* s.l., nomeadamente PoHL1 de *Borrelia lusitaniae*; PGau de *Borrelia afzelii*; Pbi Japão de *Borrelia garinii* e B31 de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Tabela 2).

As estirpes foram mantidas em cultura (em meio seletivo de BSK), tendo sido utilizadas para a preparação de antígeno indispensável para o teste de IFA *in house* e para extração de DNA borreliano utilizado como controlo positivo nos testes moleculares (*nested*-PCR).

Tabela 2. Descrição das estirpes de referência do complexo de *B. burgdorferi* s.l. utilizadas no presente trabalho.

Estirpe	Espécie	Origem biológica	Origem geográfica
PBi Japão	<i>Borrelia garinii</i>	LCR humano	Áustria
PGau	<i>Borrelia afzelii</i>	Pele humana	Alemanha
PoHL1	<i>Borrelia lusitaniae</i>	Pele humana	Portugal
B31	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>Ixodes scapularis</i>	EUA

A manutenção das estirpes de *B. burgdorferi* s.l. foi realizada por subcultura, quando estas se encontravam suficientemente densas (entre 10^7 e 10^8 bactérias/ml), para novo meio seletivo Barbour-Stonner-Kelly (BSK). A subcultura consistiu na passagem de 8 a 10 gotas, com pipeta de Pasteur de vidro estéril, de uma cultura com a densidade referida para um novo tubo com 5mL de BSK-H e incubação em estufa a 34°C (temperatura ótima de crescimento). As culturas mãe foram guardadas a 4°C, para uso a curto prazo, ou preservadas a -80°C, para uso a longo prazo.

Cada tubo de cultura foi observado, diariamente, para monitorização da presença de crescimento bacteriano, identificada através da mudança da cor do meio (de vermelho alaranjado para amarelo) como demonstrado na Figura 12 e ainda para despiste da presença de contaminação, identificada através da observação da turbidez da cultura e da visualização da mesma em microscópio de fundo escuro (Olympus® BH2).

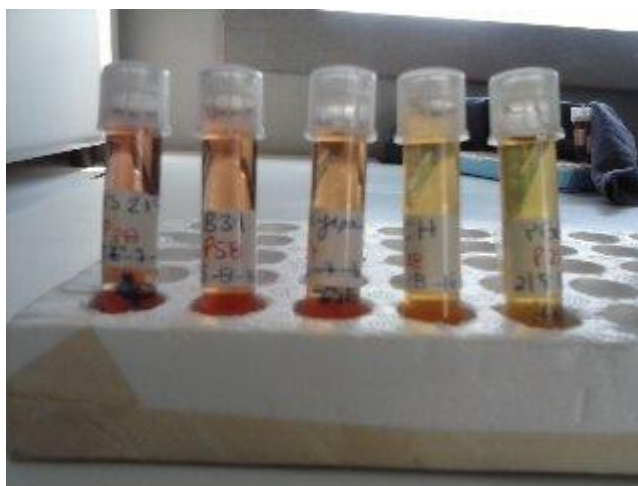


Figura 12. Tubos com cultura de espécies de *B. burgdorferi* s.l. em meio seletivo BSK (Fonte: Fotografia da autora).

2.3. Testes serológicos

Para avaliação da presença de anticorpos IgG anti- *B. burgdorferi* s.l. nos soros foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta como técnica de rastreio. Todos os soros positivos pela IFA foram confirmados pela técnica *Western Blot*, de modo a obter-se uma maior especificidade nos testes serológicos.

2.3.1. Imunofluorescência indireta (IFA) - teste de rastreio

- **Preparação das lâminas de IFA**

Para a realização da técnica de IFA *in house* foi necessário proceder-se à preparação de antígeno, o qual foi utilizado para revestir as lâminas de vidro de 10 poços para imunofluorescência (BioMérieux). Para este efeito, foram utilizadas culturas de quatro estirpes de referência anteriormente mencionadas (Tabela 2), segundo o método

descrito por Gill e Johnson (1992), com modificações introduzidas pela equipa do GLBL/IHMT (Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme/Instituto de Higiene e Medicina Tropical).

O antígeno foi preparado utilizando uma “pool” constituída por igual volume e concentração das quatro estirpes de *B. burgdorferi* s.l. Para tal, o volume total de cultura foi centrifugado a 13000 rpm durante 25 minutos a 15°C e o “pellet” daí resultante foi ressuspenso em igual volume de PBS 0.01M (pH 7.2), seguindo-se uma nova centrifugação a 13000 rpm durante 20 minutos a 15°C. O “pellet” resultante desta centrifugação foi de novo ressuspenso em PBS 0.01M (pH 7.2) e novamente centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 10°C. Em seguida, o “pellet” resultante foi ressuspenso em volume igual de PBS 0.01M (pH 7.2) por agitação no vórtex, obtendo-se assim a suspensão antigénica final.

Para garantir uma distribuição homogénea do antígeno nas lâminas foi feita a avaliação do mesmo em microscópio de fundo escuro para, se necessário, se proceder à diluição da referida suspensão.

Por fim, foram distribuídos 5µl da suspensão antigénica por poço, deixando depois as lâminas secar à temperatura ambiente até ao dia seguinte. As lâminas foram posteriormente imersas em acetona refrigerada durante 10 minutos para fixação do antígeno aos poços e, em seguida, foram lavadas com água destilada duas vezes, durante 10 minutos, sob agitação. As lâminas depois de secas foram acondicionadas em papel de alumínio e guardadas a -20°C, para posterior utilização.

- **Otimização do teste de IFA para *Borrelia burgdorferi* s.l.**

Para a realização do teste de IFA *in house* foi necessário proceder à otimização da técnica, de modo a definir o limite de positividade a utilizar neste estudo, visto não haver um consenso sobre o mesmo nos referidos testes para *B. burgdorferi* s.l. em amostras animais. Para diminuição da marcação inespecífica e redução do background foram otimizados os seguintes parâmetros: 1) determinação da diluição ótima de cada um dos anticorpos secundários utilizados; 2) avaliação do pH do tampão de lavagem (pH=7 ou pH=9); 3) adição de Azul de Evans como contracoloração.

Para avaliar o limiar de positividade para cada uma das espécies animais, cão e cavalo, foram usados dois anticorpos primários positivos de origem comercial (soro de cão do kit comercial de *Western Blot*, da Mikrogen® e soro de cavalo do kit comercial de *Western Blot*, da Virotech®) e feitas diluições seriadas de base 2 (1:32 a 1:256) de modo a determinar o limite de positividade. Para otimizar o uso do anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo conjugado específico de espécie, anti-IgG de cão (F4012, Sigma®) ou anti-IgG de cavalo (F7759, Sigma®), produzido em coelho e marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), tendo sido utilizadas várias diluições (1:20, 1:40, 1:80 e 1:120). Como controlo negativo foi utilizado o tampão de diluição de pH 7,2. O esquema da Figura 13, ilustra os ensaios realizados para otimização da IFA para cada uma das espécies animais.

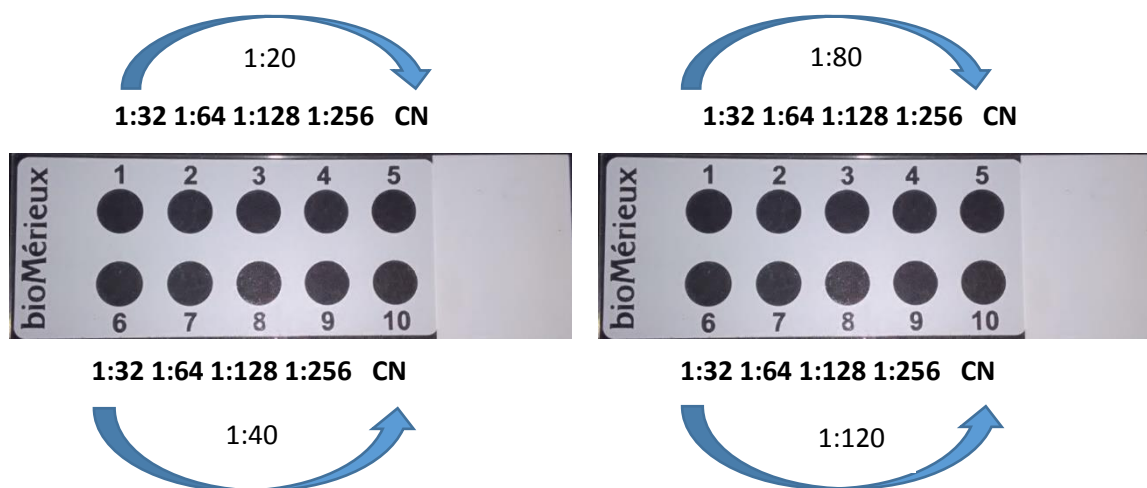


Figura 13. Esquema ilustrativo da otimização da técnica de IFA para as diversas diluições do anticorpo primário e secundário. (CN – controlo negativo)

• Teste de IFA para *Borrelia burgdorferi* s.l.

Para avaliação da presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. todas as amostras de soro foram testadas em quatro diluições de 1:2 (1:32, 1:64, 1:128 e 1:256), sendo que os soros que apresentaram algum tipo de reatividade com títulos inferiores a 1:64 foram considerados negativos, com títulos de 1:64 foram considerados não conclusivos, com títulos de 1:128 duvidosos e com títulos de 1:256 as amostras foram consideradas positivas para a presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l..

Foi utilizado como controlo positivo do teste um soro positivo fraco na diluição 1:5 (soro de cão do kit comercial de *Western Blot*, da Mikrogen® e soro de cavalo do kit comercial de *Western Blot*, da Virotech®) e, como controlo negativo, foi usado o tampão de diluição de pH 7,2. Todas as diluições foram realizadas em microplaca de 96 poços, utilizando o referido tampão de diluição.

As lâminas previamente preparadas com o antígeno foram descongeladas, tendo sido colocados 4µL, por poço, de cada uma das diluições de soro, e de ambos os controlos positivo e negativo. Em seguida, as lâminas foram a incubar a 37°C em câmara húmida durante 30 minutos, sendo depois lavadas com tampão de lavagem pH 9, duas vezes, durante 10 minutos cada, de modo a retirar qualquer anticorpo não ligado. Em seguida, foi colocado o anticorpo secundário, um conjugado específico de espécie, anti-IgG de cão ou anti-IgG de cavalo, marcado com FITC. O conjugado anti-IgG de cão foi diluído a 1:40 e o conjugado anti-IgG de cavalo foi diluído a 1:80, com tampão de diluição pH 7,2 e adicionada uma solução de Azul de Evans (0,5µl/ml) para contracoloração. Foram adicionados 4µl do anticorpo secundário por poço e procedeu-se à incubação a 37°C durante 30 minutos em câmara húmida. Em seguida as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem pH 9, duas vezes, durante 10 minutos cada, de modo a retirar o anticorpo secundário não ligado. Em seguida procedeu-se à montagem das lâminas, utilizando uma mistura de glicerol e tampão de lavagem (50/50). A leitura foi feita num microscópio de fluorescência (BX60 Olympus®), num comprimento de onda de excitação entre 460 e 490 nm, com recurso à objetiva de imersão.

Na presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. nos soros, ocorre a ligação destes ao antígeno fixado na lâmina, sendo emitida fluorescência devido à reação antígeno-anticorpo (Figura 14). Com base na literatura (Lindenmayer *et al.*, 1990; Burbelo *et al.*, 2011) foi considerado como limiar de positividade um título igual a 1:256 para o teste de IFA.

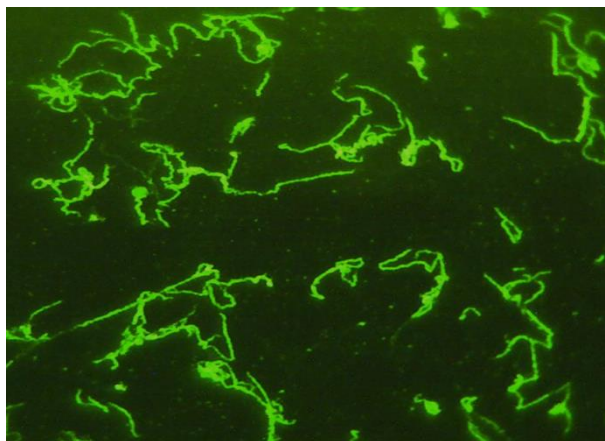


Figura 14. Microfotografia de uma reação positiva em imunofluorescência indireta (ampliação 1000x) (Fonte: fotografia da autora).

2.3.2. Western Blot (WB) – Teste de confirmação

Para confirmação dos soros positivos na IFA foi utilizada a técnica de *Western Blot*, recorrendo ao kit comercial “Borrelia Veterinary plus OspA LINE” (Sekisui Diagnostics, Virotech®). Este kit utiliza vários antígenos recombinantes das principais espécies de *B. burgdorferi* s.l. designadamente VlsE, OspA, DbpA, OspC, p39, p58 e p83, imobilizados em tiras de nitrocelulose (Figura 15).

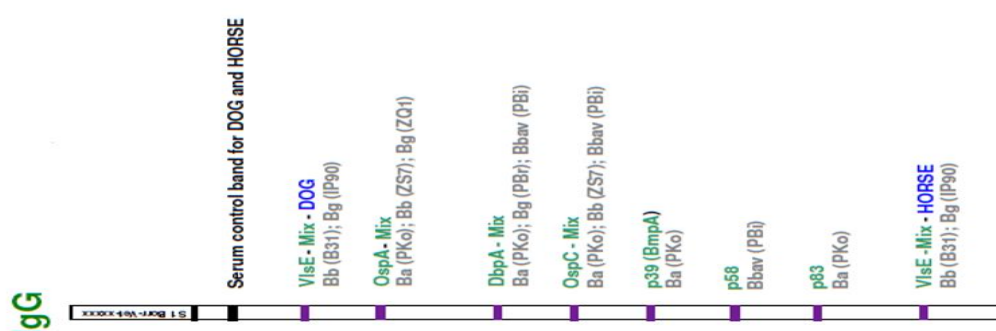


Figura 15. Imagem ilustrativa de uma membrana de nitrocelulose do kit comercial de *Western Blot*, com os diversos antígenos recombinantes de *B. burgdorferi* s.l. (Borrelia Veterinary plus OspA LINE).

De acordo com as recomendações do fabricante, cada membrana foi incubada durante 30 minutos com o soro a testar numa diluição de 1/100 em tampão do kit (pH 7,2) para que nos soros em que existam anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. IgG, estes possam ficar imobilizados nos locais de reconhecimento do antígeno. Os anticorpos não ligados foram eliminados pela lavagem das membranas três vezes com tampão de lavagem durante 5 minutos cada. As membranas foram posteriormente sujeitas a uma incubação, durante 30 minutos, com o anticorpo secundário conjugado (com enzima fosfatase alcalina) do tipo IgG, anti-cão ou anti-cavalo, numa diluição 1/100 em tampão do kit (pH 7,2). Em seguida, foram lavadas três vezes, em tampão do kit, durante 5 minutos cada, e uma vez durante 1 minuto em água destilada para eliminação do excesso de anticorpo secundário. Por fim, para visualização da reação antígeno-anticorpo, foi adicionado um substrato da enzima (BCIP/NBT), que se converte num precipitado nos locais onde ocorreu ligação antígeno-anticorpo. Após incubação de 12 minutos com o substrato, as membranas são lavadas três vezes com água destilada de modo a parar a reação.

Todo o procedimento foi realizado no equipamento de *Western Blot*, AutoBlot 3000 (Medtec®) e a avaliação de cada teste é feita, após a secagem das membranas, pela observação das bandas imunorreativas que surgem, sendo que o teste é validado através do aparecimento da banda de controlo do soro, e da comparação da intensidade das bandas face à banda de “cut-off” no controlo positivo.

Os critérios de interpretação, facultados pelo fabricante do kit, para as amostras de cão e cavalo estão apresentados em anexo (Anexo 1 e 2).

2.4. Testes moleculares

De modo a evitar possíveis contaminações, todo o procedimento foi realizado obedecendo às boas práticas laboratoriais, com separação das áreas laboratoriais de trabalho, da utilização de lixívia a 1,5% para limpeza da bancada, e uso de batas e luvas descartáveis e, ainda, a utilização de pontas com filtro. Foi também feito o rastreio de uma eventual contaminação no procedimento de extração, pela inclusão de uma amostra de água bidestilada autoclavada, que funcionou como controlo negativo de extração.

2.4.1. Extração de DNA de culturas de *Borrelia burgdorferi* s.l. e de amostras biológicas

Para a extração de DNA da cultura de *B. burgdorferi* s.l. (PGau, *B. afzelii*) e dos soros foi utilizado o kit “*QIAamp*® DNA MiniKit” da Qiagen, com algumas alterações ao procedimento descrito pelo fabricante.

Para o efeito foram utilizados 150µl de volume inicial da amostra e este foi centrifugado a 6100xg durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados 180µl de tampão ATL (tampão de lise), DNA de salmão inativado (10mg/mL) e esferas de cerâmica de 0,5mm a cada amostra e, em seguida, procedeu-se à destruição das células no *Fast Prep* (Savant®) 2 vezes a 6.5 msec⁻¹ durante 20s. Os tubos foram arrefecidos em gelo e realizou-se uma centrifugação rápida (1200 rpm, 20s). No fim, foi adicionado 60µl de tampão AE (tampão de eluição) a cada tubo, sendo que estes ficaram 5 minutos a incubar à temperatura ambiente, e foram depois a centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos, obtendo assim o DNA de cada amostra. O restante procedimento foi realizado de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante.

O DNA obtido foi analisado por espectrofotometria (*NanoDrop* 2000, *Thermo Scientific*®) para determinação da respetiva concentração e pureza e, em seguida, guardado a -20°C para posterior utilização nos testes moleculares. Para avaliação da pureza das amostras, foram medidos os valores de absorvância a 230 nm, 260 nm, e a 280nm, para determinar os rácios de 260/280 nm e 260/230 nm, sendo que estes valores devem variar entre 1,8 e 2.

Procedeu-se à extração de DNA de uma cultura de *B. burgdorferi* s.l. (estirpe PGau, de *B. afzelii*) para utilização como controlo positivo nas técnicas moleculares. Após homogeneização da cultura, foi retirado 1mL para um tubo *ependorf*®, centrifugado a 6100 xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi eliminado, tendo sido adicionado o mesmo volume de soro fisiológico estéril e em seguida homogeneizado no vórtex. A suspensão bacteriana foi sujeita a nova centrifugação e, no final o *pellet* foi ressuspenso em 150µl de soro fisiológico estéril. Esta suspensão foi submetida ao protocolo de extração de DNA anteriormente descrito.

2.4.2. Detecção de DNA de *Borrelia burgdorferi* s.l por *nested-PCR*

• Determinação da sensibilidade analítica

O DNA utilizado para a determinação da sensibilidade analítica foi obtido a partir de DNA extraído de diluições seriadas (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 bactérias/ml) realizadas a partir de culturas “mãe” da estirpe de referência (*B.afzelii*) utilizadas neste trabalho. Estas culturas “mãe” foram previamente analisadas no espectrofotômetro e selecionadas as que tinham um crescimento de 10^8 ou 10^7 bactérias/ml. As diluições seriadas das suspensões bacterianas foram sujeitas a extração de DNA utilizando o método anteriormente descrito.

As suspensões de DNA obtidas foram utilizadas nos protocolos de amplificação de DNA por *nested-PCR* para a região intergênica 5S-23S e, amplificação parcial do gene *flaB* para determinação do limite de detecção de ambos os protocolos.

• *Nested-PCR*

O DNA extraído das amostras biológicas foi sujeito a amplificação pela técnica molecular de *nested-PCR*, usando *primers* específicos para a região intergênica 5S (*rrf*)-23S (*rrl*) e para uma sequência parcial do gene *flaB*. As amostras positivas para uma das regiões alvo anteriores foram também testadas para a região alvo *ospC* (tabela 3).

Tabela 3. Informação sobre as sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na técnica de *nested-PCR* para *B. burgdorferi* s.l.

Região genômica alvo	Primers	Sequência nucleotídica (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
Região intergênica 5S(<i>rrf</i>)-23S(<i>rrl</i>)	23SN1 23SC1	ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC TAAGCTGACTAATACTAATTACCC	380 pb	Rijpkema <i>et al.</i> , 1995
	23SN2 5SC2	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG	230 pb	
<i>flaB</i>	FlaB_1 FlaB_2	AA ^R GAATTGGCAGTTCAATC GCATTTTC ^W ATTTTAGCAAGTGATG	497 pb	Clark <i>et al.</i> , 2005
	FlaB_3 FlaB_4	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGTTCTA GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT	389 pb	
<i>ospC</i>	OspC1_F OspC1_R	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	635 pb	Bunikis <i>et al.</i> , 2004
	OspC2_F OspC2_R	TATTAATGACTTTATTTTATTTATATCT TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG	584 pb	

(^R: 50% A ou 50%G, ^W: 50% A ou 50% T)

Cada mistura reacional inclui água estéril destilada livre de DNases/RNases, GIBCO (Invitrogen®), 400µM de dNTPs (Promega®), 0,5µM de cada par de *primer* (STAB Vida®), 2,5mM de MgCl₂ (Promega®), tampão concentrado 1X (Promega®) e 1U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (Promega®). As misturas reacionais foram preparadas para um volume final de 25µl, sendo que na primeira amplificação foi adicionada 2,5µl de amostra a testar, e na segunda foi adicionada 2µl do produto amplificado da 1ª reação.

Cada experiência de amplificação incluiu um controlo positivo (descrito em 2.4.1.) e um controlo negativo (água estéril destilada livre de DNases/RNases, GIBCO, Invitrogen®). Todas as amplificações da técnica de *nested*-PCR foram executadas no termociclador C1000™ *Thermal Cycler* BioRad®.

As amostras foram testadas para duas regiões alvo, região intergénica 5S-23S e *flaB*, de acordo com os programas de amplificação apresentados nos Quadros 2 e 3. As amostras positivas para qualquer uma destas duas regiões alvo, foram também testadas para a região alvo *ospC*, de acordo com o programa de amplificação apresentado na Quadro 4.

Quadro 2. Programa de amplificação para a região intergénica 5S-23S por *nested*-PCR

Amplificação da região intergénica 5S-23S			
1ª amplificação		2ª amplificação	
1 ciclo	Desnaturação inicial a 95°C, 3min	1 ciclo	Desnaturação inicial a 95°C, 3 min
25 ciclos	Desnaturação a 95°C, 30s <i>Annealing</i> a 52°C, 30s Extensão a 72°C, 60s	40 ciclos	Desnaturação a 95°C, 30s <i>Annealing</i> a 55°C, 30s Extensão a 72°C, 60s
1 ciclo	Extensão final a 72°C, 5min	1 ciclo	Extensão final a 72°C, 5min

Quadro 3. Programa de amplificação parcial do gene *flaB* por *nested*-PCR

Amplificação do <i>flaB</i>			
1ª amplificação		2ª amplificação	
1 ciclo	Desnaturação inicial a 94°C, 5min	1 ciclo	Desnaturação inicial a 94°C, 5 min
40 ciclos	Desnaturação a 94°C, 30s <i>Annealing</i> a 52°C, 30s Extensão a 72°C, 60s	30 ciclos	Desnaturação a 94°C, 30s <i>Annealing</i> a 55°C, 30s Extensão a 72°C, 60s
1 ciclo	Extensão final a 72°C, 7min	1 ciclo	Extensão final a 72°C, 7min

Quadro 4. Programa de amplificação para *ospC* por *nested*-PCR

Amplificação da <i>OspC</i>			
1ª amplificação		2ª amplificação	
1 ciclo	Desnaturação inicial a 94°C, 3min	1 ciclo	Desnaturação inicial a 94°C, 3 min
35 ciclos	Desnaturação a 94°C, 30s <i>Anneling</i> a 52°C, 30s Extensão a 72°C, 60s	40 ciclos	Desnaturação a 94°C, 30s <i>Anneling</i> a 52°C, 30s Extensão a 72°C, 60s
1 ciclo	Extensão final a 72°C, 7min	1 ciclo	Extensão final a 72°C, 7min

Os produtos amplificados através da técnica de *nested*-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x, feito a partir de um tampão 5x concentrado (54g de Trizma Base, 27,5g de ácido bórico e 20 mL de uma solução 0,5M de EDTA, pH 8 para um volume total de 1L de água destilada) ao qual foi adicionado o marcador de ácidos nucleicos *RedSafe*TM (concentração final de 1/200) (INtRON Biotechnology[®]). Foram analisados 8µl de amostra por poço e utilizado um marcador de peso molecular 100 pb (Bioline[®]). A eletroforese decorreu a uma voltagem de 90 volts, durante 90 minutos, sendo o gel observado e fotografado sob luz ultravioleta no equipamento BioDoc-It imaging system (VMR[®]), para visualização dos produtos de DNA amplificados com tamanho compatível com o do DNA de *Borrelia burgdorferi* s.l. para cada um dos alvos moleculares testados.

- **Sequenciação**

Para confirmação da presença do agente nas amostras em estudo foi realizada a sequenciação de todos os fragmentos amplificados pela técnica de *nested*-PCR para ambos os alvos genómicos, 5S (*rrf*) – 23S (*rrl*) rRNA e *flaB*, pela empresa StabVida®. Para o efeito, foram utilizados os *primers* internos de cada região alvo designadamente 23SN2 e 5SC2 (região intergénica) e FlaB_3 e FlaB_4 (gene *flaB*). As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas pelo programa BLAST e comparadas com as sequências existentes na base de dados GenBank para identificação da genoespécie. As sequências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit® para comparação das sequências nucleotídicas obtidas.

2.5 Análise e tratamento de dados

Os dados recolhidos relativos às amostras e os resultados obtidos foram organizados numa base de dados de Excel (Versão 2010). Para análise e interpretação dos resultados foram elaboradas tabelas, quadros e gráficos elucidativos dos resultados obtidos utilizando os programas Word, Excel, Power Point (Versão 2010) do Windows 7 da Microsoft®.

3. Resultados

3.1 Características epidemiológicas das populações animais em estudo

3.1.1 População de cães

As 114 amostras séricas de cães utilizadas neste estudo são originárias de cinco distritos de Portugal Continental, nomeadamente Aveiro, Beja, Leiria, Lisboa e Setúbal, e das duas regiões autónomas, Madeira e Açores (Figura 16).



Figura 16. Representação geográfica dos locais de proveniência das amostras séricas de cães (n= 114).

Cerca de 25% das amostras são provenientes do distrito de Beja (24,6%), seguindo-se os distritos de Setúbal com 18,4%, Aveiro com 15,8% e Leiria com 14%. Lisboa e as regiões autónomas dos Açores e Madeira contribuíram com 9,6%, 7% e 2,6%, respetivamente. Em 7,9% das amostras não foi possível obter informação sobre a sua origem geográfica (Figura 17).

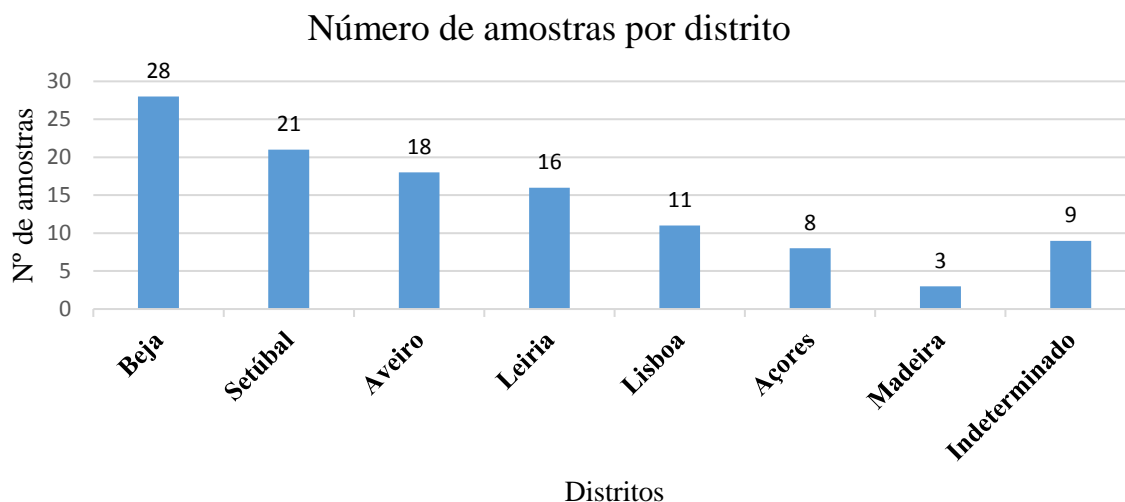


Figura 17. Número e distribuição por distrito das amostras séricas de cães (n=114).

As informações epidemiológicas fornecidas permitiram fazer a caracterização da população de cães no que respeita à raça, grupo etário, sexo e exposição a agentes patogénicos com os quais a população em estudo esteve em contacto.

As amostras analisadas pertencem a nove raças, sendo a mais representada a raça Pastor Alemão com 48,2% (55/114). Das restantes amostras, 29,9% (34/114) pertencem a outras raças, tais como Labrador, Pastor Belga, Malinois, Pastor Holandês, Dobermann, Rottweiler e Spitz e, em 21,9% (25/114) dos animais não foi possível obter a informação relativa à raça. A maioria destes animais são animais adultos, machos 72% (82/114), com mais de 18 meses (Figura 18).

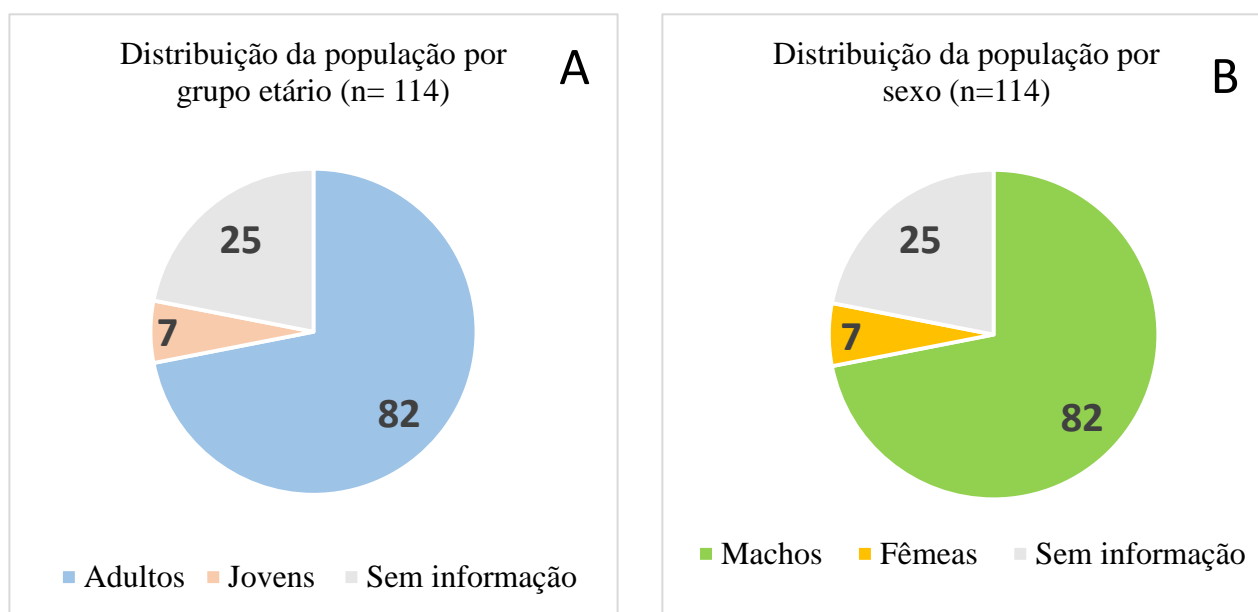


Figura 18. Número e distribuição das amostras séricas de cães: A) por grupo etário e B) por sexo.

Em estudos anteriores foi feita a caracterização de 94 das 114 amostras quanto à prevalência de anticorpos contra outros agentes patogénicos, nomeadamente *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* e *Leishmania infantum*. Foi encontrada uma prevalência de 17% para anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum*, agente transmitido pelo mesmo vetor que *Borrelia burgdorferi*. Também foram detetados anticorpos contra outros agentes, nomeadamente *Babesia canis* (3,2%), *Ehrlichia canis* (6,4%), *Rickettsia conorii* (48,9%) e *Leishmania infantum* (12,7%) (Figura 19).

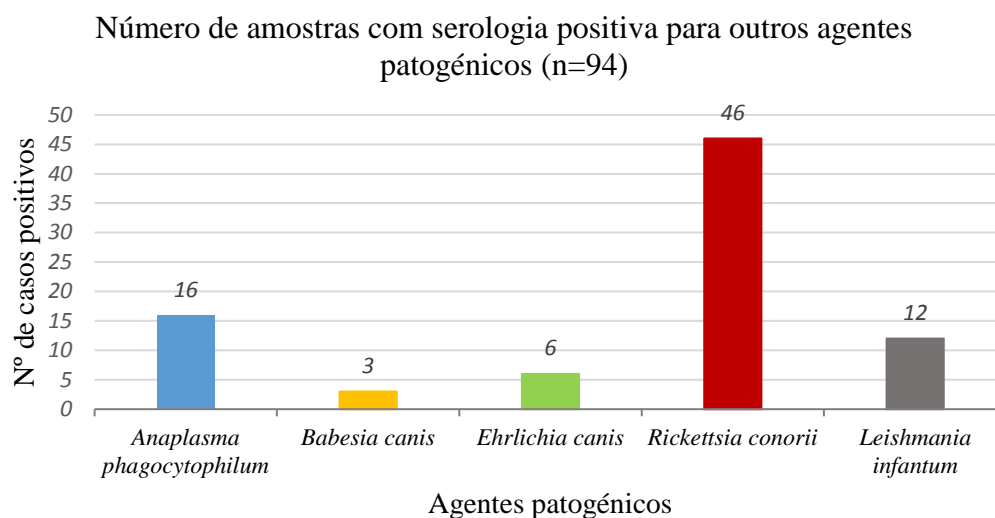


Figura 19. Representação gráfica das características epidemiológicas da população de cães em estudo no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por vetores.

3.1.2 População de cavalos

As 126 amostras séricas de cavalos utilizadas neste estudo são originárias de 11 distritos de Portugal Continental, nomeadamente do Algarve, Beja, Braga, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Leiria, Lisboa, Portalegre, Santarém e Setúbal (Figura 20).

Grande parte das amostras são provenientes dos distritos de Lisboa (23,8%) e Castelo Branco (21,4%), seguindo-se os distritos de Santarém com 12,7% e Algarve com 8,7%. Outros distritos, designadamente Portalegre (5,6%), Coimbra (4%), Évora (2,4%), Leiria e Setúbal (ambos com 1,6%), e Beja e Braga (ambos com 0,7%), contribuíram com um número mais reduzido de amostras para este estudo. Das restantes amostras (16,7%) não foi possível obter informação relativa à sua origem geográfica (Figura 21).



Figura 20. Representação geográfica dos locais de proveniência das amostras séricas de cavalos (n= 126).

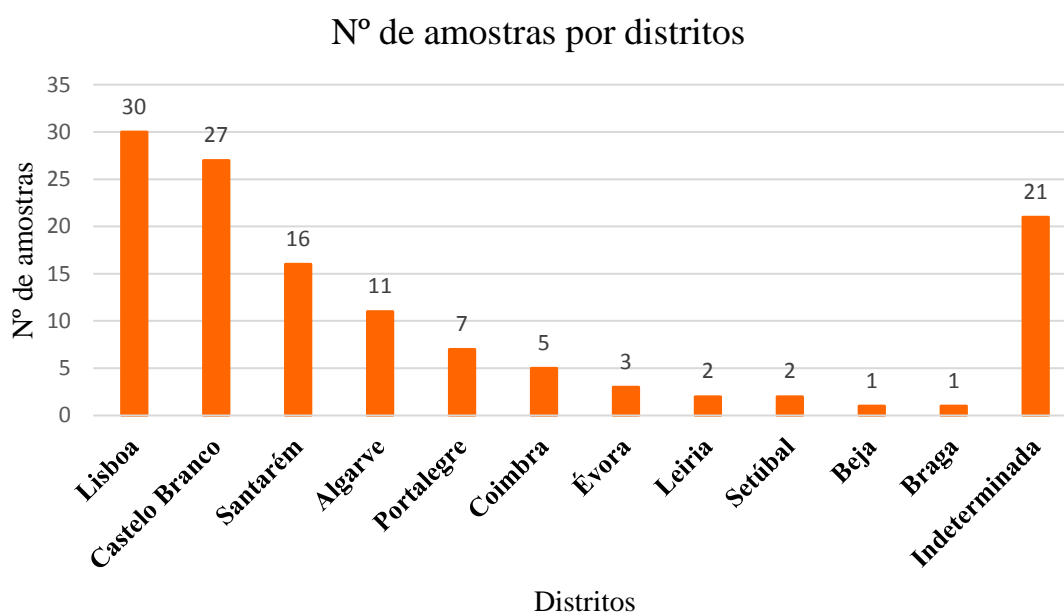


Figura 21. Número e distribuição por distrito das amostras séricas de cavalos (n=126).

As informações epidemiológicas fornecidas permitiram caracterizar a população de cavalos no que respeita à raça, grupo etário, sexo, e exposição a outros agentes patogénicos com o qual a população em estudo esteve em contacto.

As amostras de cavalos analisadas pertencem a seis raças, sendo a raça Puro Sangue Lusitana a mais representada, com 33,3% (42/126), enquanto as restantes cinco raças (Cruzado Português, Puro Sangue Árabe, Royal Warmblood Studbook of the Netherlands e Cavalo Português de Desporto) correspondem a 5,6% (7/126). Em 61,1% (77/126) dos animais não foi especificada a raça, e em 67% (84/126) dos animais não foi especificada a idade. Os animais de idade adulta, com 3 ou mais anos, representam 20% (35/126) da população total e, na sua maioria (43%) são machos (54/126) (Figura 22).

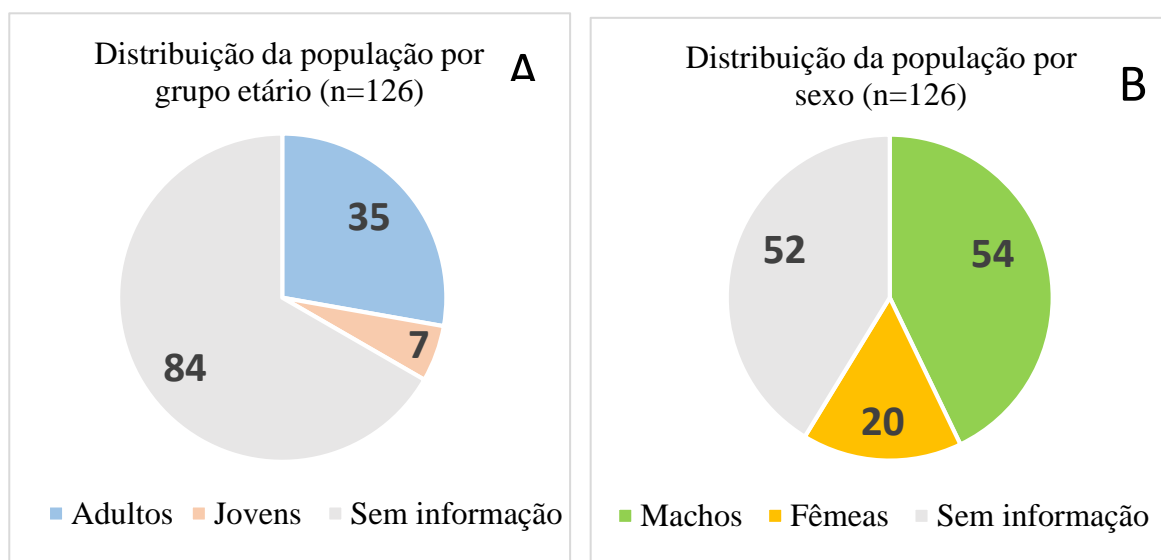


Figura 22. Número e distribuição das amostras séricas de cavalos: A) por grupo etário e B) por sexo.

Estudos anteriores, realizados nestas amostras, referentes à pesquisa de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por carraças, nomeadamente *Theileria equi* e *Babesia caballi*, indicaram que população de cavalos apresenta uma prevalência de 61,9% (78⁺/126) de anticorpos anti-*Theileria equi*, e de 10,3% (13⁺/126) de anticorpos anti-*Babesia caballi*. Foi ainda determinado que 9,5% (12⁺/129) da população apresentava serologia positiva para ambos os agentes (Figura 23).

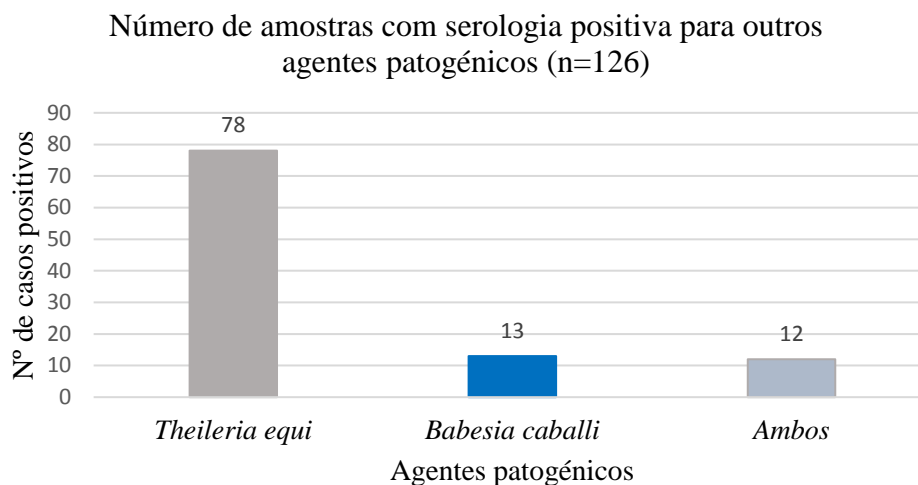


Figura 23. Representação gráfica das características epidemiológicas da população de cavalos em estudo no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por carraças.

3.2 Detecção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. por IFA e WB

3.2.1 Imunofluorescência Indireta (IFA)

- **Otimização da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFA)**

Foram otimizados vários parâmetros na técnica de IFA para obtenção do melhor sinal de imunomarcacão nas borrelías com a menor fluorescência de fundo e para determinacão da diluicão mais apropriada do anticorpo secundário conjugado com FITC.

Foi observado que a utilizacão do tampão de lavagem com pH mais alto (pH 9) favorecia a observacão da imunofluorescência específica e que a introdução do corante Azul de Evans, como contracoloracão, trouxe também beneficio na análise e interpretação das lâminas de IFA.

Relativamente à diluicão dos anticorpos conjugados verificou-se que, para as amostras de cães, a diluicão ideal é de 1:40, enquanto para as amostras de cavalos, a diluicão adequada é de 1:80, pois estas correspondem às diluicões onde se observavam

sinais de fluorescência mais intensos, comparativamente às outras diluições testadas, sem observação de fluorescência de fundo (*background*), que interfira na leitura das lâminas (Figura 24).

No que respeita à identificação dos títulos de positividade para ambas as espécies animais em estudo, a pesquisa bibliográfica efetuada mostrou, tal como referido anteriormente na introdução, que não existe consenso acerca do limiar de positividade para estes animais. Foi utilizado o título de positividade igual ou superior a 1:256, título igualmente considerado na técnica de IFA na componente humana.

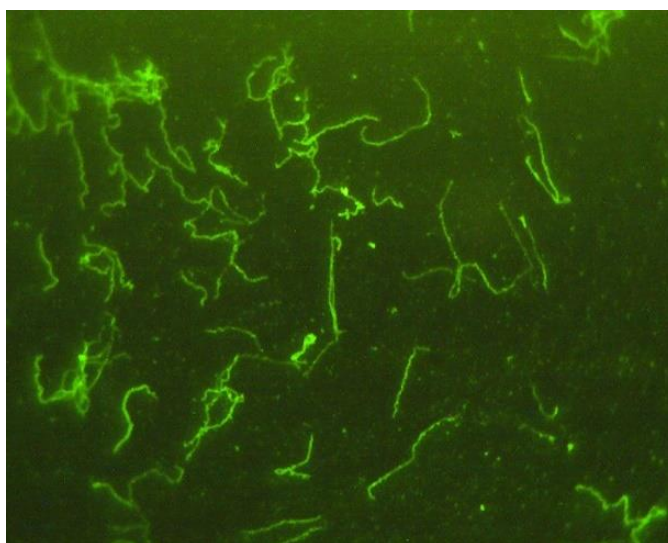


Figura 24. Microfotografia ilustrativa da reação de imunofluorescência positiva (ampliação 1000x) (Fonte: fotografia da autora).

• Populações de cães

O teste de IFA *in house* foi realizado em 114 amostras de cães para a deteção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* do tipo IgG. As amostras foram testadas em várias diluições (1:32, 1:64, 1:128 e 1:256) e, com base nos critérios de interpretação estabelecidos, os resultados serológicos foram organizados em quatro grupos (positivo, duvidoso, não conclusivo e negativo), sendo as amostras com título igual ou superior a 1:256 consideradas positivas para a presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. (Figura 25).

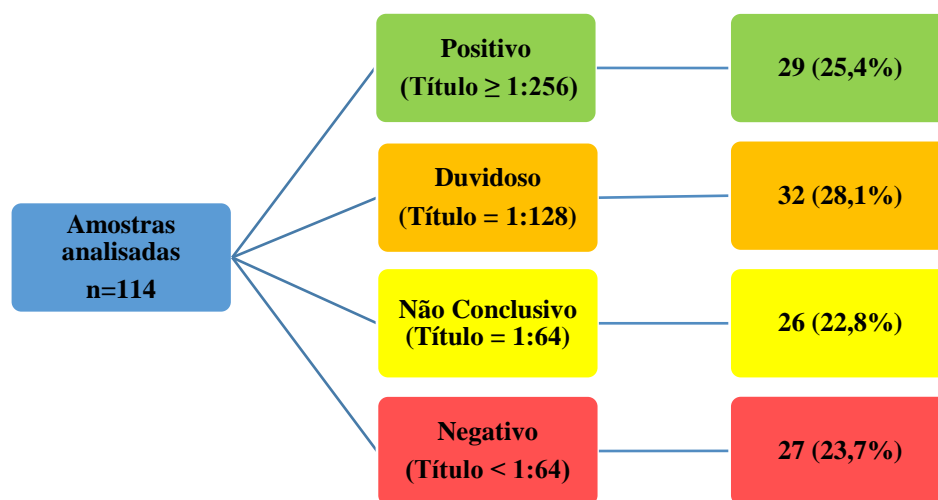


Figura 25. Esquema ilustrativo dos resultados obtidos na IFA para a população de cães.

A população de cães apresentou valores semelhantes entre os vários títulos, com 25,4% da população em estudo a apresentar um título positivo. A restante população apresenta um título duvidoso (28%) ou não conclusivo (23%), sendo que 24% da população é negativa para a presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l..

As amostras com título positivo pertencem, maioritariamente, a animais do sexo masculino (62%) oriundos de vários distritos.

A ocorrência de animais com serologia positiva é diferente entre os distritos (Tabela 4). Globalmente, Beja é o distrito que apresenta maior frequência de cães serologicamente positivos (8,8%), seguido dos distritos de Aveiro e Setúbal (ambos com 5,2%), Lisboa (3,5%) e Leiria (0,9%). Em duas amostras serologicamente positivas (1,8%) não foi possível obter informação sobre a localização geográfica. Nas regiões autónomas da Madeira e dos Açores não foram detetadas amostras seropositivas.

Tabela 4. Número e frequência dos resultados obtidos pela técnica de IFA na população de cães

Distrito	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Frequência relativa por distrito (%)	Frequência relativa global (%)
Beja	28	10	35,7	8,8
Aveiro	18	6	33,3	5,2
Setúbal	21	6	28,6	5,2
Lisboa	11	4	36,4	3,5
Leiria	16	1	6,3	0,9
Açores	8	0	0	0
Madeira	3	0	0	0
Indeterminado	9	2	22,2	1,8
Total	114	29		25,4

Considerando a informação fornecida acerca das características epidemiológicas da população de cães em estudo, no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por vetores, verificou-se que 5,3% (5⁺/94) da população apresentava serologia positiva para *B. burgdorferi* s.l. e *Anaplasma phagocytophilum*, agentes transmitidos pelo mesmo vetor, *Ixodes ricinus*. A ocorrência simultânea de serologia positiva para *B. burgdorferi* s.l. e outro agente foi também encontrada, designadamente em 2,1% (2⁺/94) dos animais que apresentavam serologia positiva para *Ehrlichia canis*, 6,4% (6⁺/94) para *Rickettsia conorii* e 2,1% (2⁺/94) para *Leishmania infantum*. Dos animais em estudo, apenas 18% (17⁺/94) apresentava serologia positiva apenas para *B. burgdorferi* s.l.

• Populações de cavalos

O teste de IFA *in house* foi realizado em 126 amostras de cavalos para a deteção de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l.. Tal como referido para a população de cães, as amostras foram testadas em quatro diluições (1:32, 1:64, 1:128 e 1:256) e, com base nos critérios de interpretação estabelecidos, os resultados serológicos foram também

organizados em quatro grupos (positivo, duvidoso, não conclusivo e negativo), sendo as amostras com título igual ou superior a 1:256 consideradas positivas para a deteção de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. (Figura 26).

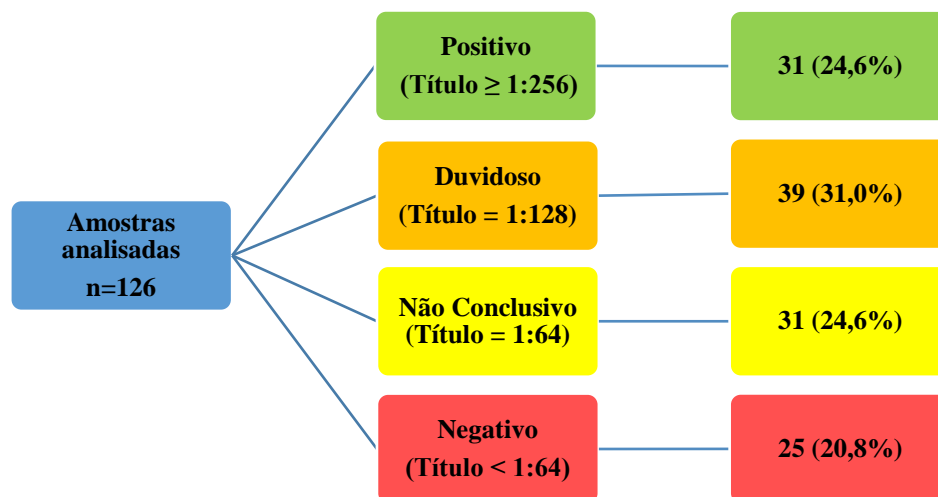


Figura 26. Esquema ilustrativo dos resultados por IFA na população de cavalos.

A população de cavalos apresentou valores semelhantes entre os vários títulos, com 24,7% da população a apresentar um título positivo. As amostras seropositivas pertencem maioritariamente a machos (39%) oriundos de diferentes distritos.

A ocorrência de cavalos serologicamente positivos foi diferente entre os distritos (Tabela 5). Globalmente, o distrito de Lisboa apresentou maior frequência (8,7%), seguindo-se os distritos de Castelo Branco (4,8%), Algarve (3,2%), Coimbra (1,6%) e, por último, os distritos de Setúbal, Évora, Beja, Santarém e Portalegre (0,8%), contribuindo cada um com apenas uma amostra serologicamente positiva. Em três amostras serologicamente positivas (2,4%) não foi possível obter informação sobre a localização geográfica. Não foram detetadas amostras seropositivas em Braga e Leiria.

Tabela 5. Número e frequência dos resultados obtidos pela técnica de IFA na população de cavalos

Distrito	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas	Frequência relativa por distrito (%)	Frequência relativa global (%)
Lisboa	30	11	36,7	8,7
Castelo Branco	27	6	22,2	4,8
Algarve	11	4	36,4	3,2
Coimbra	5	2	40	1,6
Beja	1	1	100	0,8
Santarém	16	1	6,3	0,8
Setúbal	2	1	50	0,8
Évora	3	1	33,3	0,8
Portalegre	7	1	14,2	0,8
Braga	1	0	0	0
Leiria	2	0	0	0
Indeterminado	21	3	14,3	2,4
Total	126	31		24,7

Considerando a informação relativa às características epidemiológicas da população de cavalos em estudo, no que respeita à presença de anticorpos contra outros agentes patogénicos transmitidos por carraças, constatou-se que 13,5% (17⁺/126) das amostras foram seropositivas para *B. burgdorferi* s.l. e *Theileria equi*, e 3,2% (4⁺/126) foram seropositivas para *B. burgdorferi* s.l. e *Babesia caballi*. Apenas 10,3% (13⁺/126) foram serologicamente positiva para *B. burgdorferi* s.l..

3.2.3 Western Blot (WB)

A técnica de *Western Blot* foi utilizada para confirmar a seroreatividade das amostras que se revelaram positivas pela técnica de IFA que, previamente, foi executada como técnica de rastreio.

Embora os critérios internacionais recomendem também a confirmação das amostras duvidosas obtidas pela técnica de rastreio, por razões de ordem económica não foi possível alargar este estudo a um maior número de amostras, pelo que as amostras duvidosas de ambas as populações, cães (n=32) e cavalos (n=39), não foram sujeitas a confirmação.

• Populações de cães

As amostras com título positivo pela técnica de IFA (n=29) foram sujeitas à técnica de WB para confirmação da presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. do tipo IgG. Com base na informação relativa à interpretação do kit, disponibilizada pelo fabricante, o padrão e/ou intensidade das bandas reativas encontrada não é considerada como resultado positivo, pelo que nenhuma das 29 amostras testadas foi confirmada com o kit comercial de WB utilizado.

Apesar de nenhuma das amostras seropositivas no teste de rastreio ter sido confirmada pela técnica de WB, foi observada reatividade em algumas bandas para os antígenos OspA e OspC, resultado que pode ser interpretado como uma possível vacinação do animal (Figura 27).

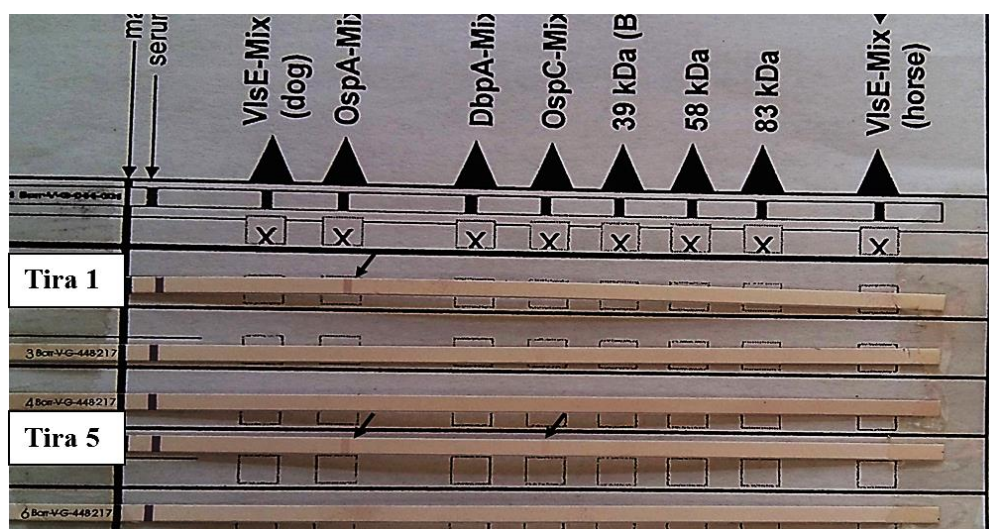


Figura 27. Fotografia ilustrativa do resultado obtido pelo teste de *Western Blot* nas amostras de cães (Tira 1 – controlo positivo, tira 5 - amostra com reatividade para banda específica OspA e OspC). As setas indicam as reações antigénicas positivas.

• Populações de cavalos

As amostras de cavalos com título positivo pela técnica de IFA (n=31) foram igualmente confirmadas pela técnica de WB.

Com base nos critérios de interpretação do kit, foi confirmada a seroreatividade para uma amostra oriunda da região de Lisboa. Esta amostra apresentou um padrão de reatividade e intensidade das bandas compatível com seroreactividade positiva (Figura 28), com reação para os antígenos VIse, p39 e p83 que, segundo os critérios de interpretação, correspondem a casos de infeções disseminadas de BL. Apesar de menos visível foi também observada ligeira reatividade nos antígenos DbpA e p58 que, segundo os mesmos critérios de interpretação, estão associados a situações de resposta imune em situações de infeções de BL avançadas ou disseminadas.

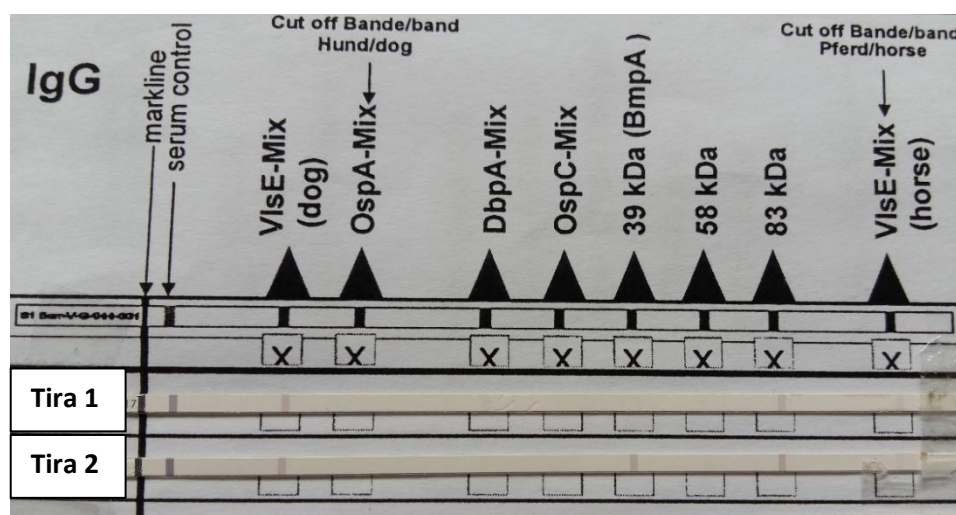


Figura 28. Fotografia ilustrativa do resultado obtido pela técnica de *Western Blot* nas amostras de cavalos (Tira 1 – controlo positivo, tira 2 - amostra positiva com imunorreacção mais intensa para os antígenos VIse, p39 e p83 e mais ténue para DbpA e p58).

3.3 Deteção molecular de *Borrelia burgdorferi* s. l.

3.3.1 Caraterização do DNA extraído

O DNA obtido das amostras, incluindo os controlos positivos, foi analisado por espectrofotometria para determinação da respetiva concentração e pureza.

As suspensões de DNA extraído das amostras séricas apresentaram valores de concentração entre 1,5 e 25,4 ng/μl. Em relação à qualidade do DNA extraído, o rácio 260/280 apresentou um valor médio de 1,85 ($\pm 0,36$), enquanto o rácio 260/230 apresentou um valor médio de 1,43 ($\pm 0,83$). Globalmente, a qualidade do DNA extraído é adequada à realização da técnica de PCR.

3.3.2. Determinação da sensibilidade analítica da técnica de *nested-PCR*

Foi determinada a sensibilidade analítica da técnica de *nested-PCR* para amplificação do DNA borreliano nas amostras biológicas em estudo. Foram utilizadas oito diluições seriadas de base 10 (10^7 a 10^0) da estirpe de *B. afzelii*, sendo o DNA de cada diluição extraído e utilizado para a amplificação de ambos os alvos genómicos, designadamente região intergénica 5S-23S e gene *flaB*.

O limite de deteção da amplificação por *nested-PCR* da região intergénica foi de 10 bactérias/mL, tal como o limite de deteção da amplificação por *nested-PCR* do *flaB* (Figura 29).

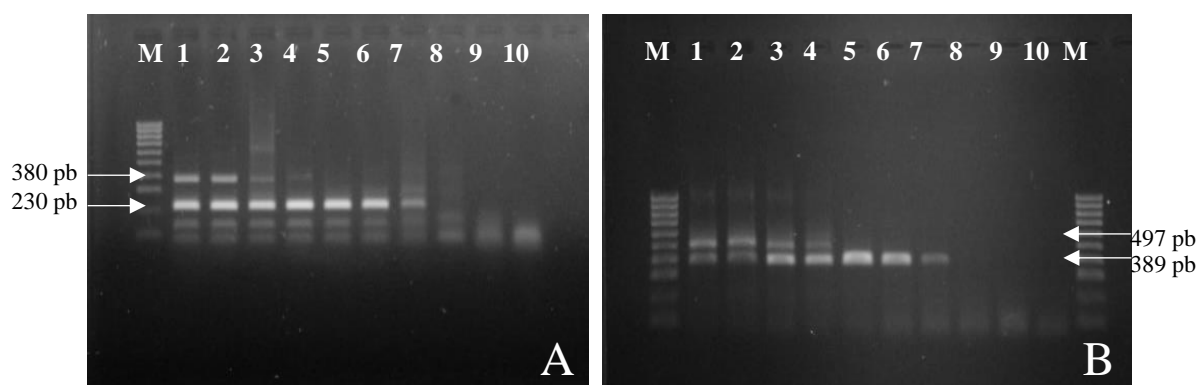


Figura 29. Imagens ilustrativas do limite de deteção da técnica de *nested-PCR* 5S(*rrf*) – 23S (*rrl*) rRNA (A) e *flaB* (B) usando diluições seriadas de uma cultura de *B. afzelii*. M – marcador de peso molecular de 100pb; colunas 1 a 8 – diluições seriadas de uma suspensão de *B. afzelii* (10^7 a 10^0 bactérias/mL). As colunas 7 (A, B) mostram o limite de sensibilidade de 10 bactérias/mL para ambos os alvos genómicos; Colunas 9 e 10 – controlo negativo de PCR da 1ª e 2ª amplificação, respetivamente.

3.3.3 Amplificação de DNA borreliano por *nested*-PCR

• População de Cães

Foram analisadas 114 amostras séricas por *nested*-PCR para amplificação da região intergénica 5S(*rrf*)–23S(*rrl*) rRNA e amplificação parcial do gene *flaB*. Das 114 amostras analisadas nas técnicas de amplificação molecular foram detetadas, no total, oito amostras positivas, sendo que cinco amostras foram positivas na amplificação da região intergénica (Figura 30) e quatro amostras foram positivas na amplificação da região *flaB*. Do conjunto das amostras positivas, foi encontrada uma amostra positiva na amplificação de ambos os alvos genómicos, oriunda do distrito de Lisboa e pertencente a um macho jovem da raça Labrador. Esta amostra também foi serologicamente positiva pela técnica de IFA.

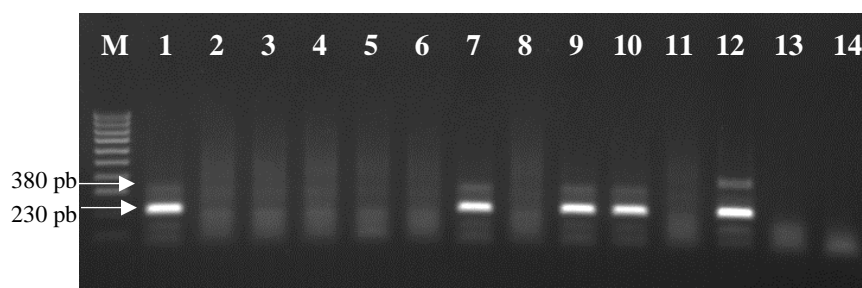


Figura 30. Gel de eletroforese representativo da amplificação de DNA por *nested*-PCR do espaço intergénico do 5S(*rrf*) – 23S (*rrl*) rRNA de *B. burgdorferi* s.l. em amostras de cães: M – marcador de peso molecular 100pb; colunas 1 a 10 – amostras de soro; coluna 11- controlo negativo de extração; coluna 12 – controlo positivo de PCR; coluna 13- controlo negativo da primeira amplificação de PCR; coluna 14- controlo negativo da segunda amplificação de PCR.

No que respeita à amplificação parcial do gene *ospC*, nenhuma das amostras positivas na amplificação para os alvos genómicos anteriores se mostrou positiva na amplificação deste alvo genómico.

Foi constatado que as amostras positivas na amplificação molecular são, na sua maioria, oriundas dos distritos do sul de Portugal. A presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. foi detetada em amostras dos distritos de Beja (n=4), Lisboa (n=2) e Setúbal (n=1).

Foi também detetado, pela primeira vez nestes animais, a presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. na ilha da Madeira (Figura 31).

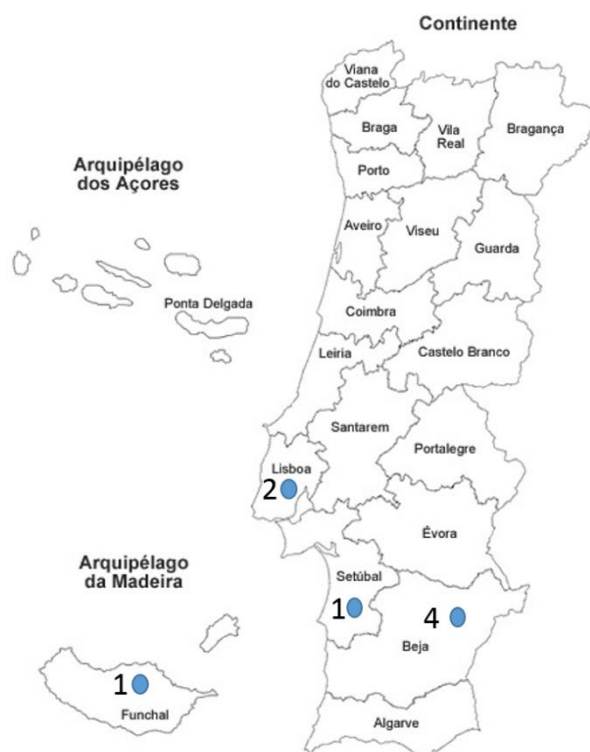


Figura 31. Distribuição geográfica das amostras de cães positivas por *nested*-PCR para deteção de *B. burgdorferi* s.l..

• População de cavalos

Das 126 amostras séricas sujeitas a amplificação por *nested*-PCR para ambos os alvos genómicos, 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e *flaB*, foram obtidos um total de sete positivos, sendo uma amostra positiva para a região intergénica e seis amostras positivas para o gene *flaB* (Figura 32). Nenhuma das amostras positivas para os alvos genómicos anteriores se revelou positiva na amplificação por *nested*-PCR de *ospC*.



Figura 32. Gel de eletroforese representativo da amplificação de DNA por *nested-PCR* do gene *flaB* de *B. burgdorferi* s.l. em amostras de cavalos: M – marcador de peso molecular 100pb; colunas 1 a 16 – amostras de soro; coluna 17 – controle positivo com DNA de *B. burgdorferi* s.l. coluna 18- controle negativo do primeiro ciclo de PCR; coluna 19- controle negativo do segundo ciclo de PCR.

Foi constatado que as amostras positivas na amplificação molecular são, na sua maioria, oriundas dos distritos do centro de Portugal. As amostras positivas para a presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. são provenientes dos distritos de Castelo Branco (n=2), Lisboa (n=2), Coimbra (n=1), Santarém (n=1) e Portalegre (n=1) (Figura 33).

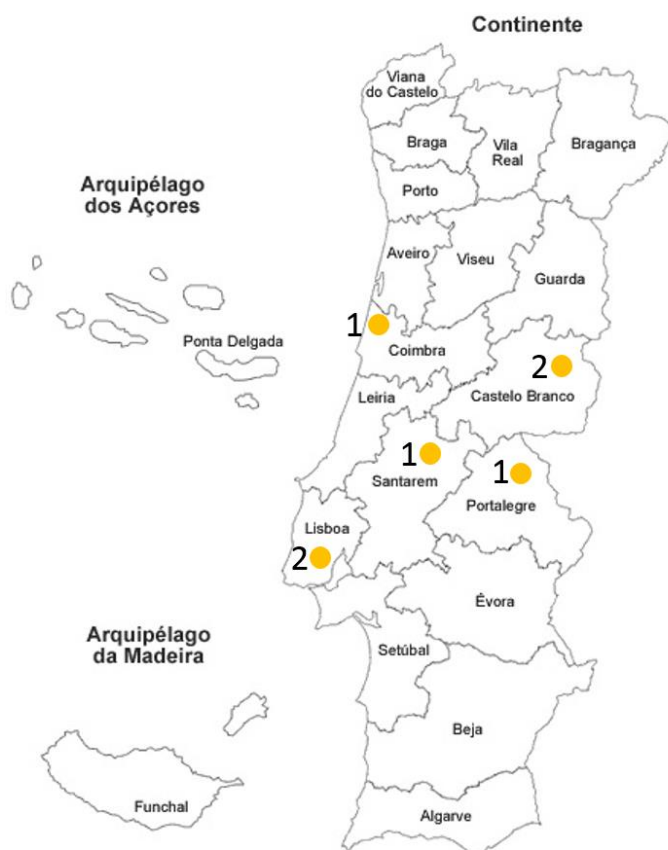


Figura 33. Distribuição geográfica das amostras de cavalos positivas por *nested*-PCR para detecção de *B. burgdorferi* s.l..

3.3.4 Sequenciação de DNA de *Borrelia burgdorferi* s.l.

- **População de cães**

A sequenciação dos produtos amplificados por *nested*-PCR para ambos os alvos genómicos, 5S(rrf)–23S(rrl) rRNA e *flaB*, permitiu obter as sequências nucleotídicas para confirmação da presença de DNA de *Borrelia* do complexo *B. burgdorferi* s.l..

A análise destas sequências e a sua comparação com as sequências existentes na base de dados GenBank para o complexo *Borrelia burgdorferi* s.l., usando o programa BLAST, permitiu identificar *B. afzelii* nas amostras positivas para ambos os alvos genómicos, apresentando similaridades de 99%. As novas sequências nucleotídicas obtidas foram depositadas no GenBank com os números de acesso KU891495 e KU891496.

• População de cavalos

A análise das sequências nucleotídicas obtidas pela sequenciação dos produtos amplificados por *nested-PCR* para 5S(rrf) – 23S(rrl) rRNA e *flaB* permitiu confirmar a presença do agente em estudo, tendo sido identificadas *B. afzelii* em três amostras provenientes dos distritos de Portalegre, Coimbra e Lisboa, *B. burgdorferi* s. s. em duas amostras do distrito de Castelo Branco, *B. valaisiana* numa amostra do distrito de Lisboa e *B. lusitaniae* numa amostra do distrito de Santarém, apresentando similaridades de 98-99%.

3.4 Análise comparativa dos resultados

A análise do conjunto dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas laboratoriais, serológica e molecular, permitiu a identificação de amostras simultaneamente positivas para ambas as técnicas (Figuras 34 e 35).

Globalmente, verificou-se a existência de anticorpos IgG anti- *B. burgdorferi* s.l. e a presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. em 3,5% (4⁺/114) dos cães, oriundos dos distritos de Beja e Lisboa, e em 3,2% (4⁺/126) dos cavalos, oriundos dos distritos de Lisboa, Santarém e Portalegre.

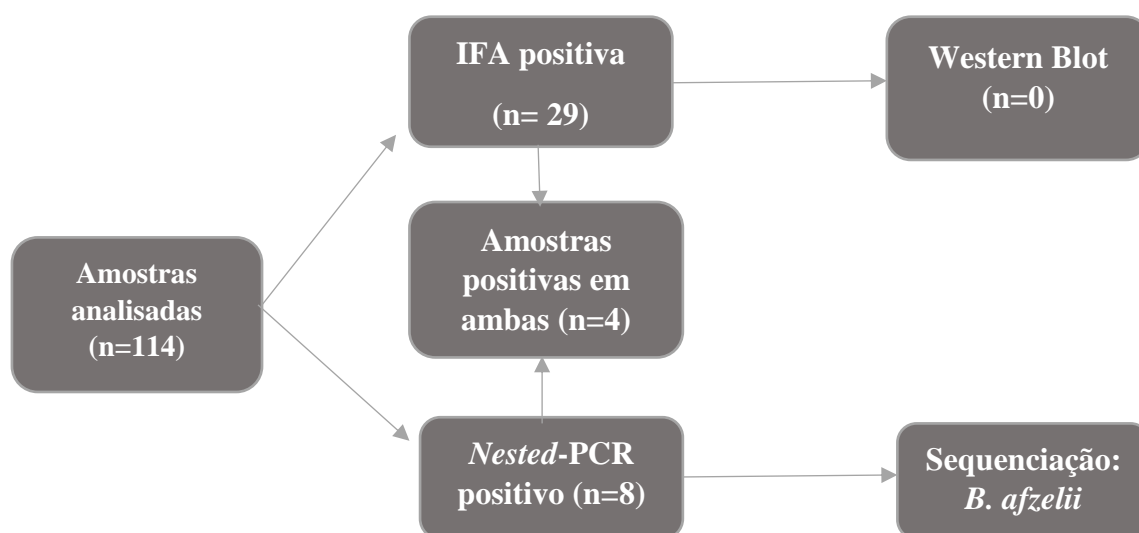


Figura 34. Esquema ilustrativo dos resultados obtidos pelas técnicas serológicas e moleculares para as amostras de cães.

Das amostras de cães em que foi detetada a presença de DNA borreliano, quatro apresentam igualmente anticorpos para *B. burgdorferi* s.l., e dois são serologicamente duvidosos. Os outros dois animais positivos nas técnicas moleculares não apresentam títulos significativos para *B. burgdorferi* s.l., no entanto, ambos são serologicamente positivos para *A. phagocytophylum* e um deles possui igualmente anticorpos anti-*Ehrlichia* (Anexo 3).

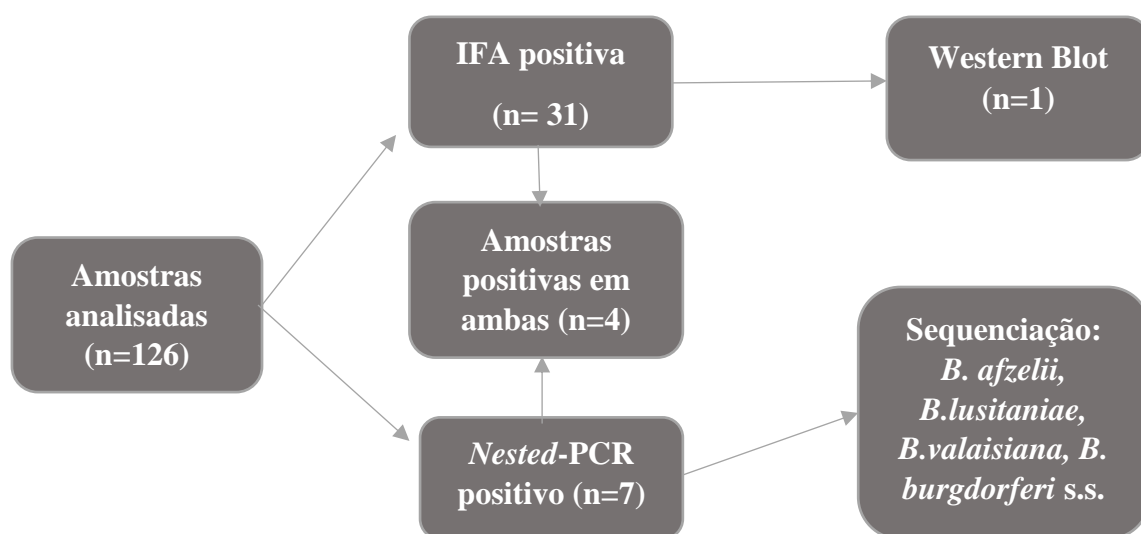


Figura 35. Esquema ilustrativo dos resultados obtidos pelas técnicas serológicas e moleculares para as amostras de cavalos.

As amostras de cavalos em que foi detetada a presença de DNA borreliano apresentam igualmente anticorpos para *B. burgdorferi* s.l., com exceção para os dois animais do distrito de Castelo Branco, que são serologicamente negativos. O cavalo com serologia positiva confirmada pela técnica de WB foi negativo para os testes moleculares (Anexo 4).

4. Discussão e Conclusões

Nos últimos anos, o interesse pela Borreliose de Lyme tem vindo a aumentar não só no nosso país, mas também no resto da Europa, devido ao aumento de casos que têm vindo a ser reportados, e ao reconhecimento da expansão geográfica do vetor que transmite o agente etiológico (Lindgren and Jaenson, 2006; ECDC, 2016c). Esta doença apresenta uma grande diversidade de manifestações clínicas, com quadro clínico comum a outras doenças, o que torna difícil o seu diagnóstico (Stanek, 2012).

No contexto veterinário, o estudo da BL tem também crescido, uma vez que a seroprevalência tem vindo a aumentar nos animais (Mannelli *et al.*, 2012). Nestes, o diagnóstico clínico é ainda mais complexo que nos humanos, por o Eritema Migrante ser uma condição rara (Chomel, 2015).

Desta forma, este estudo teve com objetivo caracterizar por técnicas serológicas e moleculares, duas populações de animais assintomáticos, cães e cavalos, no que respeita à infeção por *B. burgdorferi* s.l.. Estes animais domésticos partilham os mesmos ambientes que o Homem e, apesar de serem animais assintomáticos sabe-se, por estudos anteriores, que são animais expostos a outros agentes patogénicos transmitidos por vetores, incluindo *Ixodes ricinus* que também transmite *B. burgdorferi* s.l. (Alho *et al.*, 2016). Desta forma, a amostragem das populações em estudo não foi aleatória já que os animais selecionados para o estudo tiveram como critério de inclusão a possível exposição ao vetor.

Neste estudo foram analisadas 240 amostras séricas de animais oriundos de várias regiões do país, onde a presença do vetor (Santos-Silva, 2011; Lopes de Carvalho, 2010) e do agente (De Michelis, 2000; Maia, 2015) foi também já reportada.

As características epidemiológicas dos cães e cavalos incluídos no estudo, no que respeita a fatores como idade, sexo, raça e distrito de origem, apresentaram uma distribuição heterogénea. Por se tratar duma amostragem pequena, não aleatória e heterogénea, não foram aplicados testes estatísticos para avaliar a correlação entre a infeção por *B. burgdorferi* s.l. e os parâmetros anteriores. Todavia, em estudos anteriores verificou-se que não existia nenhuma relação entre os fatores atrás referidos na infeção por *B. burgdorferi* s.l. (Alexandre, 2005; Almeida, 2015). Para algumas amostras

incluídas no estudo não foi possível obter informação relativa às características acima referidas, uma vez que os inquéritos epidemiológicos não estavam completos por omissão de informação na requisição de análise ao INIAV.

A análise serológica dos animais em estudo foi realizada através das técnicas de IFA e WB para deteção e identificação de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. do tipo IgG.

Os testes serológicos são de rápida execução e permitem a deteção de anticorpos específicos no soro, produzidos após contacto com o agente infeccioso. No presente trabalho foi implementada uma técnica de IFA *in house*. Para este efeito, foi necessário proceder-se à preparação das lâminas de IFA, as quais foram preparadas com uma suspensão antigénica de uma *pool* de quatro genoespécies, designadamente *B. afzelii*, *B. garinii* e *B. burgdorferi* s.s., que representam as genoespécies mais prevalentes em animais, e *B. lusitaniae*, por ser a mais prevalente no vetor, em Portugal (De Michelis, 2000; Kurtenbach *et al.*, 2001; Lopes de Carvalho, 2010).

Foram obtidos valores de seroprevalência de aproximadamente 25% quer para os cães (25,4%) quer para os cavalos (24,7%), evidenciando o contato com o agente em estudo. O valor encontrado para os cães é superior ao descrito em outros estudos para regiões específicas, designadamente 12,7% no distrito de Bragança (Figueiredo, 2007), 9% no distrito de Setúbal (Núncio, *et al.*, 1999) e 2,25% na região do Algarve (Alexandre, 2005). No que diz respeito aos cavalos, é desconhecida a existência de estudos anteriores realizados no nosso país, pelo que não é possível fazer comparação dos nossos resultados. No entanto, o valor de seroprevalência encontrada no nosso estudo aproxima-se dos valores registados em outras regiões da Europa, nomeadamente em Itália (Ebani *et al.*, 2012), Polónia (Štefančíková *et al.*, 2008), Dinamarca (Hansen *et al.*, 2010) e Áustria (Butler *et al.*, 2016), onde a presença de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* foi detetada com valores de seroprevalência de 24,3%, 25,6%, 33,3% e 45%, respetivamente.

A seroreactividade encontrada para ambas as populações foi diferente entre os diversos distritos, observando-se que Lisboa e Beja apresentam as frequências relativas mais elevadas enquanto em Leiria não foram encontradas amostras seropositivas para os cavalos e apenas se encontrou um cão seropositivo, apresentando baixa taxa de frequência. Estes resultados estão de acordo com a distribuição do vetor já enunciado por Santos-Silva e colaboradores (2011), que referem a existência de diferenças na

distribuição do vetor entre os diversos distritos, sendo a presença do vetor mais marcada no sul de Portugal.

As várias condições que se encontram nos distritos ao nível de humidade, disponibilidade de hospedeiros, entre outros, poderá influenciar a taxa de sobrevivência e reprodução dos vetores e, deste modo, influenciar as taxas de infeção/contato, explicando as diferenças observadas entre os vários distritos (Lindgren and Jaenson, 2006).

Os valores elevados de seroprevalência encontrados, no presente estudo, refletem a elevada exposição ao vetor e, conseqüente, contato com o agente, a que estes animais estão sujeitos. Por outro lado, a elevada prevalência observada pode também resultar da existência de falso-positivos, devido à ocorrência de reações cruzadas com antígenos de outras bactérias afins, tal como as espiroquetas que causam doença periodontal (Alexandre, 2005). Adicionalmente, a subjetividade da leitura e interpretação do grau de fluorescência observada nos testes de IFA e a definição do limiar de positividade podem levar a diferentes resultados.

De facto, nos estudos realizados em animais, a ausência de padronização e a falta de consenso na interpretação da técnica de IFA constitui uma dificuldade, designadamente no que respeita ao limiar de positividade aceite. Vários estudos realizados em Portugal referem o título de 1:128, mas os resultados obtidos pela técnica de IFA não foram confirmados pela técnica de WB (Alexandre, 2005; Figueiredo, 2007), pelo que as taxas de seroprevalências podem estar sobrestimadas pela inclusão de falso-positivos. No presente trabalho, foi utilizado um limiar de positividade de 1:256, superior ao utilizado por alguns autores (Alexandre, 2005; Figueiredo, 2007; Ebani, 2012), e inferior ao utilizados por outros autores (Durrani *et al.*, 2011, Durrani *et al.*, 2012, Schwartz *et al.*, 2015)

Considerando os resultados obtidos para os outros agentes transmitidos por vetores, estes sugerem a possibilidade de ocorrência de co-infeções, quer nos cães (entre o agente em estudo, *B. burgdorferi* s.l, e *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *R. conorii* e/ou *L. infantum*), quer nos cavalos (entre *B. burgdorferi* s.l e *T. equi* e/ou *B. caballi*). As co-infeções são recorrentes e já foram descritas também em estudos anteriores (Hansen *et al.*, 2010; Dziegiel *et al.*, 2016). Estes resultados demonstram que os animais em estudo

estão expostos a diversos agentes, podendo influenciar os resultados de IFA através da ocorrência de reações cruzadas.

Embora a técnica de IFA tenha várias vantagens, entre as quais ser rápida e sensível, tem como desvantagem a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, pelo que é recomendado pelas instituições internacionais (EUCALB, 2016; ECDC, 2016a) que se recorra a uma técnica de confirmação, tal como o teste de WB, com sensibilidade e especificidade conhecidas. Em geral, a desvantagem deste teste, quando utilizado um kit comercial, reside no facto de ser bastante dispendioso.

Por conseguinte, para confirmação da reatividade positiva obtida pela técnica de IFA nas amostras em estudo, foi realizado um teste de *Western Blot*, tendo sido utilizado o kit comercial “Borrelia Veterinary plus OspA LINE” (Sekisui diagnostics, Virotech®). Das 60 amostras testadas foi observada reatividade numa amostra de cavalo, confirmando o resultado obtido pela técnica de IFA. O facto de apenas uma das amostras ter sido confirmada pode ter diversas explicações, entre as quais, o facto dos resultados de IFA poderem estar sobrevalorizados devido à possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, tal como foi referido anteriormente. Por outro lado, este kit comercial é recente e não informa sobre o seu limite de deteção, pelo que não sabemos se seria possível a confirmação de todas as amostras. Outro fator importante, que pode estar na explicação destes resultados, reside na diferença de antigénios utilizados entre as duas técnicas. Tal como descrito anteriormente, a suspensão antigénica utilizada na preparação das lâminas de IFA inclui quatro estirpes das genoespécies mais prevalentes em Portugal, entre as quais *B. lusitaniae*, cujos antigénios não estão incluídos no kit de WB utilizado. Por outro lado, neste kit estão presentes antigénios de *B. bavariensis*, genoespécie não reportada ainda a circular no nosso país (De Michelis, 2000; Baptista, 2004; Lopes de Carvalho, 2010).

Atualmente, não existe um kit que seja totalmente específico para BL, para uso no diagnóstico, uma vez que nos diferentes kits são utilizados antigénios de diferentes localizações geográficas com diferenças inter e intra-específicas (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). A escolha dos diferentes antigénios pode influenciar a deteção de anticorpos nas amostras. Assim sendo, seria recomendável que no futuro os kits venham a integrar

frações antigénicas recombinantes e altamente específicas de um conjunto mais alargado de espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Para deteção de DNA borreliano, foi realizada a técnica de *nested*-PCR para dois alvos genómicos, a região intergénica 5S(*rrf*)-23S(*rrl*) rRNA e o gene *flaB*, cujo o limite de deteção, para ambos os protocolos, foi de 10 bactérias/mL. Importa referir que, o método de extração de DNA utilizado foi bastante eficiente, visto o limite de deteção para a região intergénica 5S-23S ser inferior ao reportado em outros estudos (Wodecka *et al.*, 2010). Estes alvos genómicos são amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial, contudo, está descrito que a amplificação de ambos pode não acontecer para uma mesma amostra, tal como ocorreu no presente trabalho (Wodecka *et al.*, 2010). De facto, no presente trabalho, apenas uma amostra sérica de cão foi positiva para os dois alvos genómicos (região intergénica 5S-23S e *flaB*).

A presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. foi detetada em 7% dos cães e 5,6% dos cavalos. Estes valores não são muito diferentes dos encontrados noutros países da Europa, designadamente na Polónia, onde foram detetados 16,3% (Skotarczak and Wodecka, 2005) e 5% (Dziegiel *et al.*, 2016) de amostras de sangue de cães positivas por PCR, e em Itália, onde 5,1% de uma população de cavalos, oriundos da região de Lázio, apresentou DNA borreliano (Veronesi *et al.*, 2012). A amplificação do gene *ospC* foi negativa em qualquer uma das amostras positivas amplificadas pelos alvos genómicos atrás referidos, não tendo por isso sido útil a sua aplicação.

No presente trabalho verificou-se que as amostras positivas pelas técnicas moleculares estão concentradas em determinadas regiões. A maioria das amostras positivas de cães são provenientes de Beja (n=4) e Lisboa (n=2). Em geral, as amostras positivas foram detetadas no sul de Portugal e região autónoma da Madeira. Na população de cavalos, os distritos com maior número de amostras positivas foram Lisboa e Castelo Branco, com dois animais positivos por distrito, sendo que, no global, as amostras positivas foram detetadas no centro de Portugal. Lisboa representa o único distrito onde foram detetados casos positivos em ambas as populações, evidenciando o potencial risco de infeção por *B. burgdorferi* s.l. existente nesta região. É nesta que se encontra uma das áreas endémicas já identificada (Mafra), com condições ótimas de temperatura e

humidade, e presença de hospedeiros vertebrados, vetores e do agente patogénico (Batista *et al.*, 2004).

A sequenciação dos produtos amplificados da região intergénica 5S-23S rRNA e do gene *flaB* permitiu identificar *B. afzelii* em ambas as populações, designadamente em oito cães e três cavalos. Esta genoespécie foi já identificada no vetor em Portugal, nos distritos de Lisboa e Setúbal (Kurtenbach *et al.*, 2001) e, também, na ilha da Madeira (Matuschka *et al.*, 1998). *Borrelia afzelii* foi anteriormente identificada em animais, nomeadamente em javalis (*Sus scrofa*) provenientes da região norte de Portugal, de Trás-os-Montes (Faria *et al.*, 2015). Importa ainda referir que *B. afzelii* foi isolada do sangue de um cão com sinais clínicos compatíveis com BL (Speck *et al.*, 2001), demonstrando que estes animais são suscetíveis à infeção por esta genoespécie.

Na população de cavalos foram ainda detetadas outras genoespécies, nomeadamente *B. burgdorferi* s.s. (n=2), *B. valaisiana* (n=1) e *B. lusitaniae* (n=1). Também estas genoespécies foram já detetadas no vetor no nosso país (De Michaelis *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2016). Tal como já referido, *B. lusitaniae* é a genoespécie mais prevalente no vetor em Portugal e a sua deteção em cavalos já foi reportada em Itália (Veronesi *et al.*, 2012). Estes resultados demonstraram que várias genoespécies de *B. burgdorferi* s.l. se encontram em circulação nas populações em estudo.

As técnicas moleculares são sensíveis e específicas para a deteção dos agentes etiológicos. A sua aplicação pode, contudo, ser dificultada por potenciais resultados falso-positivos devido à contaminação accidental de amostras com uma pequena quantidade de DNA alvo. De facto, foram já reportados resultados de PCR falso-positivos para BL (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). No decorrer do presente trabalho, as boas práticas de laboratório e, em especial, as normas aplicadas à biologia molecular foram respeitadas e cumpridas de modo a excluir a possibilidade de produção de falso-positivos.

Importa considerar que, a presença de DNA de um agente, neste caso *B. burgdorferi* s.l., não é tacitamente sinónimo de infeção ativa, especialmente se considerarmos que estamos perante animais assintomáticos (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Num processo infeccioso, o agente tem necessariamente de estar viável e, através

da técnica de *nested*-PCR não é possível determinar a viabilidade da bactéria (Couceiro *et al.*, 2003)

Face aos resultados obtidos por ambas as técnicas, serológicas e moleculares, conclui-se que a exposição ao vetor e o contato com o agente etiológico é evidente nestas populações. Globalmente, verificou-se a existência de anticorpos IgG anti-*B. burgdorferi* s.l. e a presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. em 3,5% (4⁺/114) dos cães, oriundos dos distritos de Beja e Lisboa, e em 3,2% (4⁺/126) dos cavalos, oriundos dos distritos de Lisboa, Santarém e Portalegre. Estes resultados indicam que estes animais estiveram expostos ao agente e, eventualmente, permanecem assintomaticamente infetados. A ocorrência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. em cães saudáveis, nos quais foi também detetado DNA borreliano, foi de 2,5% num estudo realizado na Polónia (Dziegiel *et al.*, 2016).

Os distritos com maior número de amostras positivas de cães e cavalos, em ambas as técnicas (serológicas e moleculares), são Lisboa e Beja, onde também já foi evidenciada a presença de hospedeiros reservatórios e do vetor (Santos-Silva *et al.*, 2011), bem como do agente (Santos-Silva *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015). Estas evidências sugerem que estes distritos reúnem as condições necessárias para que possam ser considerados como potenciais regiões endémicas da doença.

As alterações climáticas têm contribuído para a expansão geográfica do vetor de *B. burgdorferi* s.l., aumentando deste modo a exposição dos animais ao vetor e, consequentemente, aos agentes que estes transmitem (Bengis *et al.*, 2004).

Os médicos veterinários deverão estar atentos a possíveis sinais clínicos que se possam desenvolver, pois o diagnóstico da BL continua a ser maioritariamente clínico. Em termos de diagnóstico laboratorial, o método utilizado (serológico ou molecular) deve ser aplicado consoante a fase evolutiva da doença. Por outro lado, é fundamental introduzir medidas de prevenção e controlo de vetores que, nos animais, pode passar pela utilização de acaricidas, triagem de parasitas externos pela observação cuidadosa da pelagem e, em determinadas situações, por exemplo, para cães de caça e cães militares, pela aplicação de vacinas.

O facto dos animais domésticos partilharem cada vez mais os mesmos espaços e atividades ao ar livre com os humanos, faz com que estes possam ser veículos de diversos agentes patogénicos, podendo desempenhar um papel como animais sentinela (Goossens, *et al.*, 2001; Reif *et al.* 2011) Por conseguinte, é necessário que os médicos estejam sensibilizados para a inclusão da BL no diagnóstico diferencial, tendo em conta diversos aspetos, como a mordedura de carraça ou contato com animais infetados, uma vez que, apesar dos animais domésticos não parecerem estar diretamente envolvidos no ciclo de transmissão, estes permitem que o vetor se mantenha nos diversos espaços, disponibilizando as refeições sanguíneas necessárias ao ciclo de vida do vetor.

A análise global destes resultados alerta para o potencial risco de infeção por *B. burgdorferi* s.l. a que as populações em estudo estão sujeitas. O carácter emergente da doença, com o crescente número de casos reportados reforça a importância da adoção de medidas de prevenção, para animais silváticos e domésticos e, também para a população humana, de modo a diminuir-se a prevalência desta zoonose (WHO and ECDC, 2016).

De acordo com a informação disponível, o presente trabalho foi o primeiro no nosso país a integrar uma abordagem serológica e molecular no estudo da BL em animais. Os resultados obtidos sobre a infeção em animais permitiram reconhecer o risco de BL e a identificar zonas potencialmente endémicas, onde tanto os animais como os Humanos estão em risco acrescido de infeção.

Estudos complementares e mais alargados, integrando uma amostragem aleatória representativa dos vários distritos de Portugal, serão necessários para avaliação dos vários fatores de risco associados à BL. Como conclusão, os resultados globais deste trabalho são importantes no atual conceito de “Uma Só Saúde” (*One Health*) uma vez que os animais domésticos, como os cães e cavalos, são veículos de diversos agentes patogénicos e ao partilharem os mesmos habitats que os humanos, podem servir de alerta do potencial risco para a saúde das populações.

Referências Bibliográficas

- Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. and Wormser, G. P., 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3): 484–509. DOI: 10.1128/CMR.18.3.484-509.2005.
- Alexandre, N. M. L., 2005. *Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, erlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Animal. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Alho, A. M., Pita, J., Amaro, A., Amaro, F., Schnyder, M., Grimm, F., Custódio, A. C., Cardoso, L., Deplazes, P. and Carvalho, L. M., 2016. Seroprevalence of vector-borne pathogens and molecular detection of *Borrelia afzelii* in military dogs from Portugal. *Parasites & Vectors* 9: 225. DOI: 10.1186/s13071-016-1509-2.
- Almeida, B., 2015. *Deteção molecular de protozoários e bactérias transmitidos por artrópodes vetores em cães do sul de Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Apodemus sylvaticus* (rato-do-campo) Disponível em: <http://www.biodiversidadvirtual.org/mamiferos/Apodemus-sylvaticusimg4028.html>].
- Bankhead, T. and Chaconas, G., 2007. The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. *Molecular Microbiology*, 65(6):1547–1558. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05895.x.
- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M. and Collares-Pereira, M., 2004. Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *International Journal of Medical Microbiology*. 293, 37:109-116. DOI: 10.1016/S1433-1128(04)80016-0.
- Baptista, S., 2006. *Lyme Borreliosis in Portugal: Study on Vectors(s), Agent (s) and Risk Factors*. Tese de Doutoramento de Ciências Biomédicas. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Barbour, A. G., Burgdorfer, W., Hayes, S. F., Péter, O. and Aeschlimann, A., 1983. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Current Microbiology*, 8(2): 123–126. DOI: 10.1007/BF01566969.
- Barbour, A.G. and Hayes, S. F., 1986. Biology of *Borrelia* Species. *Microbiology Reviews*, 50(4): 381–400.

- Baum, E., Grosenbaugh, D. A. and Barbour, A.G., 2014. Diversity of antibody responses to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected beagle dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(6): 838–846. DOI: 10.1128/CVI.00018-14.
- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Mörner, T. and Tate, C.M., 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Scientific and Technical Review Office International des Epizooties*, 23(2), 497-511. DOI: 10.20506/rst.23.2.1498.
- Bhide M., Travnicek M., Curlik J. and Stefancikova, A., 2004. The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review. *Veterinary Medicine*, 49(4): 135–142.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C., and Gershwin, M. E., 2014. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity*, 57: 82-115. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.09.004.
- Borrelia Veterinary plus OspA LINE IgG Line Immunoblot, Instructions for use (DE226G32), Sekisui Virotech GmbH, Germany.
- Bunikis, J., Garpmo, U., Tsao, J., Berglund, J., Fish, D. and Barbour, A. G., 2004. Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology*, 150: 1741–1755. DOI: 10.1099/mic.0.26944-0.
- Burbelo, P. D., Bren, K. E., Ching, K. H., Coleman, A., Yang, X., Kariu, T., Iadarola, M. J. and Pal, U., 2011. Antibody Profiling of *Borrelia burgdorferi* Infection in Horses. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(9):1562–1567. DOI: 10.1128/CVI.05123-11.
- Bushmich, S. L., 1994. Lyme Borreliosis in Domestic Animals. *Journal of Spirochetel and Tick-borne Diseases*, 1(1): 24–28.
- Butler, C. M., Houwers, D. J., Jongejan, F. and Van der Kolk, J. H., 2005. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses . A review. *Veterinary Quarterly*, 27(4): 146–156. DOI: 10.1080/01652176.2002.9695196.
- Butler, C. M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., Werners, A. H., Stout, T. A. E., Nielen, M., Jongejan, F., Van der Kolk, J. H. and Houwers, D. J., 2016. *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks and their equine hosts: A prospective clinical and diagnostic study of 47 horses following removal of a feeding tick. *Pferdeheilkunde*, 32 (4): 335-345 DOI: 10.21836/PEM20160406.

- Cardoso, L., Mendão, C. and De Carvalho, L. M., 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5(62). DOI: 10.1186/1756-3305-5-62.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R. J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., and M. Fraser, C., 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35(3):, 490–516. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01698.x.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lyme Disease. Disponível em: <https://www.cdc.gov/lyme/>. [Acedido em: 10-6-2016].
- Chang, Y-F., Novosol, V., McDonough, S. P., Chang, C-F., Jacobson, R. H., Divers, T., Quimby, F. W., Shin, S. and Lein, D. H., 2000. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to ixodid ticks. *Veterinary Pathology*, 37: 68–76. DOI: 10.1354/vp.37-1-68.
- Chomel, B., 2015. Lyme disease. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 34(2): 569–576.
- Clark, K., Hendricks, A. and Burge, D., 2005. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2616–2625. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2616-2625.2005.
- Cohen, D., Bosler, E. M., Bernard, W., Meirs II, D., Eisner, R. and Schulze, T. L., 1988. Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their Public Health significance. *Annals New York Academy of Sciences*, pp.244–257. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb31858.x.
- Collares-Pereira, M. and Franca, I., 2000. Borreliose de Lyme: Ocorrência em Portugal. *Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia* 58: 107–117.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S. M., Vitorino, L., Gonçalves, L., Baptista, S., Vieira, M. L. and Cunha, C., 2004. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1316-1318. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1316-1318.2004.
- Couceiro, S., Baptista, S., Franca, I., Gonçalves, L., Vieira, M. L. and Collares-Pereira, M., 2003. Cultura vs PCR: que apoio ao diagnóstico de Borreliose de Lyme? *Acta Reumatológica Portuguesa* 28 (2): 75–82.

- De Michelis, S., Sewell, H. S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. M., Benes, V., Holmes, E. C. and Kurtenbach, K., 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2128–33.
- Direcção Geral de Agricultura e Veterinária (DGAV), 2013. Resumo das características do medicamento Merilym, vacina contra Borreliose de Lyme em cães. Disponível em: <http://www.medvet.simpodium.pt/RCM/Index/1620>.
- Divers, T. J., 2013. Equine Lyme Disease. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7): 488–492.
- Durrani, A. Z., Goyal, S. M. and Kamal, N., 2011. Retrospective Study on Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* Antibodies in Horses in Minnesota. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31: 427–429. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.03.007.
- Durrani, A.Z. and Goyal, S.M., 2012. A retrospective study of *Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs in Minnesota. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(2): 137–141. DOI: 10.3906/vet-1012-633.
- Dziegiel, B., Adaszek, L., Carbonero, A., Lyp, P., Winiarczyk, M., Debieak, P. and Winiarczyk, S., 2016. Detection of canine vector-borne disease in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitology Research* 115: 1039-1044. DOI: 10.1007/s00436-015-4832-1.
- Ebani, V. V., Bertelloni, F., Pinzauti, P. and Cerri, D., 2012. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(2): 237–240.
- European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016a. A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme Borreliosis. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/lyme-borreliosis-diagnostic-accuracy-serological-tests-systematic-review.pdf> [Acedido em: 15-08-2016].
- European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016b. *Ixodes ricinus*. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/ticks/pages/ixodes-ricinus.aspx> [Acedido em: 21-05-2016].
- European Center for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016c. *Ixodes ricinus* - current known distribution. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET-maps-tick-species.aspx>. [Acedido em: 21-05-2016].
- European Concerted Action of Lyme Disease (EUCALB), 2016. Lyme Borreliosis. Disponível em: <http://www.eucalb.com/> [Acedido em: 03-04-2016].

- Faria, A. S., Paiva-Cardoso, M. N., Nunes, M., Carreira, T., Vale-Gonçalves, H. M., Veloso, O., Coelho, C., Cabral, J. A., Vieira-Pinto, M. and Vieira, M. L., 2015. First detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in serum of the wild boar (*Sus Scrofa*) in northern Portugal by *nested-PCR*. *EcoHealth* 183-187. DOI: 10.1007/s10393-014-0973-4.
- Figueiredo, T.C.D., 2007. *Estudo da prevalência de doenças associadas a vectores em cães domésticos do distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Faculdade de Medicina de Lisboa - Universidade de Lisboa.
- Franca, I., 2000. Borreliose de Lyme: Uma introdução à doença. *Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venerologia*, 58: 11–39.
- Franke, J., Hildebrandt, A. and Dorn, W., 2013. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity , ecology , and pathogenicity. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4:11–25. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.007.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O., and Venter, J. C., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660): 580-586. DOI: 10.1038/37551.
- Fritz, C. L. and Kjemtrup, A. M., 2003. Lyme borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(9): 1261–1270. DOI: 10.2460/javma.2003.223.1261.
- Gill S. J., and Johnson R. C., 1992. Immunologic Methods for the Diagnosis of Infections by *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease). In Rose R. N., De Macario E. C., Fahey J. L., Friedman H., Penn G. M. (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Fourth ed, Washington, D.C., 452–458.
- Goldstein, R., E., What to do with a positive Lyme test result. 2010, NAVIC clinican's Brief.
- Goossens, H. A. T., Bogaard, E. V. D. and Nohlmans, M. K. E., 2001. Dogs as Sentinels for Human Lyme Borreliosis in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(3): 844–848. DOI: 10.1128/JCM.39.3.844-848.2001.

- Guerra, M. A., Walker E. D., and Kitron U., 2001. Canine surveillance system for Lyme borreliosis in Wisconsin and northern Illinois: geographic distribution and risk factor analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65:546-552.
- Guo, B. P., Brown, E. L. , Dorward, D. W., Rosenberg, L. C. and Höök, M., 1998. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 30(4): 711–723. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01103.x .
- Hansen, M. G. B., Christoffersen, M., Thuesen, L. R., Petersen, M. R., Bojesen, A. M., 2010. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(3): 5–10. DOI: 10.1186/1751-0147-52-3.
- Hansmann, Y., 2009. Treatment and prevention of Lyme disease. *Current Problems in Dermatology*, 37: 111–129. DOI: 10.1159/000213071.
- Hubálek, Z., 2009. Epidemiology of Lyme Borreliosis. *Current Problems in Dermatology*, 37: 31-50. DOI: 10.1159/000213069.
- Johnson, B. J. B., 2011. Laboratory Diagnostic testing for *Borrelia burgdorferi* infection in Lyme Disease: An Evidence-based Approach. J.J. Halperin (ed.). DOI: 10.1079/9781845938048.0073.
- Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J., 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(4): 496-497. DOI: 10.1099/00207713-34-4-496.
- Karami, A., 2012. Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*. In Lyme Disease. Dr. Ali Karami (ed.). InTech China, pp 1-26. DOI: 10.5772/32742.
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R. and Weigl, E., 2007. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 151 (2): 175-186. DOI: 10.5507/bp.2007.032.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, S-H., Etti, S., Schäfer, S. M., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Haninçová, K., Labuda, M., Bormane, A. and Donaghy, M., 2001. Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4926-4929. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4926-4929.2001.

- Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J. I., Margos, G., Fish, D. and Ogden, N. H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature reviews. Microbiology* 4: 660–9. DOI: 10.1038/nrmicro1475.
- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Stepánová, G. and Macela, A., 2001. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infection and Immunity*, 69(1): 575–578. DOI: 10.1128/IAI.69.1.575-578.2001.
- Lacerta viridis* (Lagarto-verde Europeu), Disponível em: <http://www.bpo-natura.de/en/index.php?id=124>;
- Lindenmayer, J., Weber M., Bryant J., Marquez E., and Onderdonk A., 1990. Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western Immunoblot for the diagnosis of Lyme Disease in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(1): 92–96.
- Lindgren, E., and Jaenson, T. G. T., 2006. *Lyme Borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures*. World Health Organization (WHO) Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Lissman B. A. , Bosler E. M., Camay H., Ormiston, B. G. and Benach, J. L., 1984. Spirochete Associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(2): 219 – 220.
- Littman, M. P., 2003. Canine borreliosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33: 827–862. DOI: 10.1016/S0195-5616(03)00037-8.
- Littman, M. P., Goldstein, R. E., Labato, M. A., Lappin, M. R., and Moore, G. E., 2006. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (2): 422-434. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02880.x.
- Lopes de Carvalho, I. and Nuncio, M. S., 2006. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro surveillance - European Communicable Disease Bulletin*. 11:257-60.
- Lopes de Carvalho, I., 2010. *Borrelia lusitaniae and Lyme borreliosis in Portugal: A contribution to the study of an emerging bacterial zoonosis with an impact on Public Health*. Tese de Doutoramento em Biologia. Faculdade de Ciências. 196pp.
- Lopes, N. T. C., 2013. *Identificação de Genoespécies do complexo Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l) circulantes na fauna ixodideológica em Portugal*. Dissertação de Mestrado de Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa.

- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M. C., Cristóvão, J. M., Ramos, C., Martins, Â., Martinho, F., Silva, P., Neves, N., Nunes, M., Vieira, M. L., Cardoso, L. and Campino, L., 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8: 138. DOI: 10.1186/s13071-015-0759-8.
- Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L. and Gray, J., 2011. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *Federation of European Microbiological Societies* 36: 837–61. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x.
- Mannelli, A., Martello, E., Tomassone, L., Calzolari, M., Casalone, C., De Meneghi, D., Dottori, M., Estrada-Peña, A., Fabbi, M., Ferreri, L., Ferroglio, E., Luini, M., Solano, S. M., Ortega, C., Pautasso, A., Prati, P., Vesco, U. 2012. *Inventory of available data and data sources and proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals*. EFSA – External scientific report, Supporting publications, 2012: EN-234. DOI: 10.2903/sp.efsa.2012.EN-234.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H. and Fish, D., 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7): 1545–1563. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.07.022.
- Marta, F., 2009. *Borreliose de Lyme em Portugal: (novos) aspectos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infecção humana*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências.
- Matuschka, F-R., Klug, B., Schinkel, T. W., Spielman, A. and Richter, D., 1998. Diversity of european lyme disease spirochetes at the southern margin of their range. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1980-1982.
- Merino, F. J., Serrano J. L., Saz, J. V., Nebreda, T., Gegundez, M., and Beltran, M., 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *European Journal of Epidemiology*, 16: 97–100. DOI: 10.1023/A:1007690807637.
- Nascimento, M. M. A. D., 2016. *Desenvolvimento e otimização da técnica LAMP (loop-mediated isothermal dna amplification) para a identificação das principais genospecies do complexo Borrelia burgdorferi sensu lato*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), 2008. Lyme Disease: Finding the Cause of Lyme Disease. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/topics/lymeDisease/Pages/History.aspx> [Acedido em 17-06-2016].

- Norte, A. C., Alves da Silva, A., Alves, J., da Silva, L. P., Núncio, M. S., Escudero, R. and Lopes de Carvalho, I., 2015. The importance of lizards and small mammals as reservoirs for *Borrelia lusitaniae* in Portugal. *Environmental Microbiology Reports*, 7(2): 188–193. DOI: 10.1111/1758-2229.12218.
- Núncio, M..S., Peter, O., Alves, M.J., Bacellar, F. and Filipe, A.R., 1993. Isolamento e caracterização de Borrélias de *Ixodes ricinus* em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*. 16: 175-179.
- Núncio, M. S., Bacellar, F. and Filipe, A., 1999. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in Dogs from Portugal. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289: 711–716.
- Núncio, M. S. and Lopes de Carvalho, I.. Borreliose de Lyme, 2014. In Doenças Associadas a Artrópodes Vetores E Roedores. Maria Sofia Núncio e Maria João Alves (eds.) Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa. (INSA).
- Nunes, M., Parreira, R., Maia, C., Lopes, N., Fingerle, V. and Vieira, M. L., 2016. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp.. *Infection, Genetics and Evolution*. 40: 266-274.
- Parola, P. and Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans : An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 897–928. DOI: 10.1086/319347.
- Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B. and Hu, L. T., 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology* 10 (2): 87–99. DOI: 10.1038/nrmicro2714.
- Reif, J. S., 2011. Animal Sentinels for Environmental and Public Health. *Public Health Reports*, Suplemento 1, 126: 50–57. DOI: 10.1177/00333549111260S108.
- Rijpkema, S. G., Molkenboer, M. J., Schouls, L. M., Jongejan, F. and Schellekens, J. F. P., 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:3091–5.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. and Oliver J. H. Jr., 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2: 123–8. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2011.04.002.

- Ruiz-Fons, F., Fernandez-de-Mera, I. G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., and Gortazar, C., 2006. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Veterinary Parasitology*, 140 (1-2): 133-142. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.03.033.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A., De Sousa, R., Nuncio, M., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., and Bacellar, F., 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1): 85-121. DOI: 10.1007/s10493-011-9440-x.
- Santos-Silva, M. M., Santos, A. S., Lopes de Carvalho, I., Sousa, R., Alves, M. J. and Nuncio, S., 2013. Relatório Revive 2012 – Ixodídeos, Rede de vigilância de vectores. CEVDI, INSA. 69pp.
- Schwartz, G., Epp, T., Burgess, H. J., Chilton, W. B. and Cohmann, K. L., 2015. Comparison between available serologic tests for detecting antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses in Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(4): 540–546. DOI: 10.1177/1040638715587548.
- Schwartz, J. J., Gazumyan, A., and Schwartz, I., 1992. rRNA gene organization in the lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 174 (11): 3757-3765. DOI: 10.1128/jb.174.11.3757-3765.1992.
- Shaw, S. E., Binns, S. H., Birtles, R. J., Day, M. J, Smithson, R., and Kenny, M. J., 2005. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 157: 645–548.
- Singh, S. K., and Girschick, H. J., 2004. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infectious Diseases*, 4(9): 575-583. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01132-6.
- Skotarczak, B. and Wodecka, B., 2005. Identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies inducing Lyme Disease in dogs from Western Poland. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1): 13–21.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E. 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary Research*, 37: 231–244. DOI: 10.1051/vetres:2005054.
- Speck, S., Reiner, B. and Wittenbrink, M. M., 2001. Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *Veterinary Record*, 149: 19-20. DOI: 10.1136/vr.149.1.19.

- Stanek, G. and Strle, F., 2003. Lyme borreliosis. *The Lancet*, 362: 1639–1647. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14798-8.
- Stanek, G. and Reiter, M., 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex — clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4): 487–493. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., and Strle, F. 2012. Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814): 461-473. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7.
- Štefančíková, A., Adaszek, L., Peřkoř, B., Winiarczyk, S., and Dudiřák, V., 2008. Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of lyme borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 15: 37-43.
- Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R. and Steele, F. M., 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis & Rheumatology*. 20:7e17.
- Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K. and Rosa P. A. 2005. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid* 53:1–13. DOI: 10.1016/j.plasmid.2004.10.006.
- The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 2011. Lyme Disease. Disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lyme_disease.pdf [Acedido em: 30-03-2016].
- Tilly, K. , Rosa, P. A. and Stewart, P. E., 2008. Biology of Infection with *Borrelia Burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2): 217–234. DOI: 10.1016/j.idc.2007.12.013.
- Tsao, J. I., 2009. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Veterinary Research*, 40: 36. DOI: 10.1051/vetres/2009019.
- Turdus merula* (Melro-preto), Disponível em: <http://www.veterinaria-atual.pt/estudo-de-transmissao-de-doencas-infecciosas-por-aves/>.
- Uesaka, K., Maezawa, M. and Inokuma, H., 2015. Serological survey of *Borrelia* infection of dogs in Sapporo, Japan , where *Borrelia garinii* infection was previously detected. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(3): 463-465. DOI: 10.1292/jvms.15-0392.

- Van Dam A.P., 2002. Diversity of Ixodes-borne *Borrelia* species: clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2:249–54. DOI:10.1089/153036602321653833.
- Veinović, G., Filipić, B. and Stanković, J., 2013. Isolation, cultivation, and *in vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: a review. *Archives of Biological Science Belgrade*, 65(2): 533–547. DOI: 10.2298/ABS1302533V.
- Veronesi, F., Laus, F., Passamonti, F. Tesei, B., Fioretti, D. P. and Genchi, C., 2012. Occurrence of *Borrelia lusitaniae* infection in horses. *Veterinary Microbiology*, 160: 535–538. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.06.029.
- Wagner, B. and Erb, H. N., 2012. Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Preventive Veterinary Medicine*, 107: 275–279. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.07.002.
- Wodecka, B., Leońska, A., and Skotarczak, B. 2010. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *Journal of Medical Microbiology*, 59(3): 309–314. DOI: 10.1099/jmm.0.013508-0.
- World Health Organization (WHO) and European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). 2016. Lyme borreliosis in Europe. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/246167/Fact-sheet-Lyme-borreliosis-Eng.pdf?ua=1 [Acedido em: 7-4-2016].

6. Anexos

Anexo 1- Tabela de interpretação do kit de WB (Borrelia Veterinary plus Osp A Line®) para amostras de cães

dog	Finding	Interpretation
0 Band or Band < cut off	negative	No evidence for contact with pathogen

VlsE-dog		Finding	Interpretation
isolated	= cut off	negative	No evidence for contact with pathogen
	> cut off	Infection	Infection indicated
+ ≥ 1 Band (except OspA)		Infection	Infection indicated

Without OspA and without VlsE-dog	Finding	Interpretation
0 - 1 Band	Negative	No evidence for contact with pathogen
2 - 3 Bands	Borderline	Evidence for contact with pathogen
≥ 4 Bands	Infection	Infection indicated

OspA	Finding	Interpretation
Isolated or + ≥ 1 Bands (exception VlsE)	Vaccination	Vaccination
+ VlsE-dog isolated	= cut off	Vaccination
	> cut off	Vaccination + Infection
+ VlsE-dog + ≥ 1 Band	Vaccination + Infection	Vaccination and evidence for infection

Anexo 2- Tabela de interpretação do kit de WB (Borrelia Veterinary plus Osp A Line®) para amostras de cavalos

horse	Finding	Interpretation
0 Band or Band < cut off	negative	No evidence for contact with pathogen

VisE-horse	Finding	Interpretation
+ 0 - 2 Bands	Borderline	Evidence for contact with pathogen
+ ≥ 3 Bands	Infection	Evidence for infection

Special case	Finding	Interpretation
VisE-horse + DbpA + 1 Band	Infection	Evidence for infection

Without VisE-horse	Findings	Interpretation
0 - 2 Bands	Negative	No evidence for contact with pathogen
3 Bands	Borderline	Evidence for contact with pathogen
≥ 4 Bands	Infection	Evidence for infection

Anexo 3- Tabela dos resultados positivos para as técnicas serológicas e moleculares para amostras de cães (As linhas a sombreado indicam as amostras positivas pela técnica molecular).

Amostra	Distrito	Idade	Sexo	Outros agentes	PCR			IFA	WB
					5S-23S	FlaB	Seq		
229 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	+	<i>B. af</i>	+	-
236 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	+	<i>B. af</i>	Duv	N.D
238 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
239 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
242 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	+	<i>B.af</i>	+	-
255 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
259 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
300 (L)	Beja	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
CM2	Lisboa	8	F	<i>Anaplasma, Ehrlichia</i>	-	-	N.D	+	-
CM3	Lisboa	5	F	-	-	-	N.D	+	-
CM4	Lisboa	1	M	-	-	-	N.D	+	-
CM7	Lisboa	8	M	<i>Anaplasma, Ehrlichia</i>	+	-	<i>B. af</i>	Neg	N.D
CM23	Leiria	9	M	<i>Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia e Leishmania</i>	-	-	N.D	+	-
CM26	N.D	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
CM27	N.D	N.D	N.D	-	-	-	N.D	+	-
CM31	Aveiro	6	M	<i>Anaplasma, Rickettsia</i>	-	-	N.D	+	-
CM33	Aveiro	4	M	<i>Rickettsia</i>	-	-	N.D	+	-
CM34	Aveiro	4	M	<i>Anaplasma</i>	-	-	N.D	+	-
CM40	Aveiro	5	M	<i>Anaplasma</i>	-	-	N.D	+	-
CM46	Aveiro	10	M	-	-	-	N.D	+	-
CM49	Aveiro	2	M	-	-	-	N.D	+	-
CM50	Beja	7	M	-	-	-	N.D	+	-
CM55	Setúbal	1	M	-	-	-	N.D	+	-
CM57	Lisboa	0,583	M	-	+	+	<i>B.af</i>	+	-
CM61	Setúbal	6	M	<i>Rickettsia</i>	-	-	N.D	+	-
CM77	Setúbal	4	M	-	+	-	<i>B. af</i>	Duv	N.D
CM83	Setúbal	4	M	-	-	-	N.D	+	-
CM85	Setúbal	9	M	-	-	-	N.D	+	-
CM88	Setúbal	4	M	-	-	-	N.D	+	-
CM94	Setúbal	7	M	<i>Rickettsia</i>	-	-	N.D	+	-
CM98	RA Madeira	6	M	<i>Anaplasma</i>	+	-	<i>B. af</i>	N. conc.	N.D
CM104	Beja	5	M	<i>Leishmania</i>	-	-	N.D	+	-
CM109	Beja	3	M	<i>Rickettsia</i>	+	-	<i>B.af</i>	+	-

F-feminino; M-masculino; -Negativo; + Positivo; N.conc.–Não conclusivo; Duv- Duvidoso; Neg- Negativo; N.D–Não determinada; *B. af*–*B. afzelii*

Anexo 4- Tabela dos resultados positivos para as técnicas serológicas e moleculares para amostras de cavalos (As linhas a sombreado indicam as amostras positivas pela técnica molecular).

Amostra	Distrito	Idade	Sexo	Outros agentes	PCR			IFA	WB
					5S-23S	FlaB	Seq		
10-12755	Setúbal	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-13469	Lisboa	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-15131	Beja	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
10-15898	Indeterminada	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-20813	Lisboa	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
10-31423	Indeterminada	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
10-31791	Algarve	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-31792	Algarve	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-31792	Algarve	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
10-35064	Lisboa	N.D	N.D	-	-	-	-	+	+
10-37009	Lisboa	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-37010	Lisboa	N.D	N.D	-	-	-	-	+	-
10-45812	Lisboa	N.D	N.D	-	+	-	<i>B. val</i>	+	-
15-20950	Coimbra	5	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-20951	Coimbra	9	M	-	-	-	-	+	-
15-21371	Indeterminada	17	M	-	-	-	-	+	-
15-23366	C. Branco	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	+	<i>B.b.s.s.</i>	Neg	
15-23374	C. Branco	N.D	F	<i>Theileria</i>	-	+	<i>B.b.s.s.</i>	Neg	
15-23377	C. Branco	N.D	F	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-23381	C. Branco	N.D	F	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-23382	C. Branco	N.D	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-23383	C. Branco	N.D	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-23387	C. Branco	N.D	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-23392	C. Branco	N.D	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-24554	Évora	N.D	M	<i>Theileria, Babesia</i>	-	-	-	+	-
15-24911	Lisboa	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
15-24914	Lisboa	N.D	N.D	<i>Theileria, Babesia</i>	-	-	-	+	-
15-26848	Lisboa	3	M	<i>Babesia</i>	-	+	<i>B. af</i>	+	-
15-29531	Coimbra	3	F	-	-	+	<i>B. af</i>	Duv	
15-30726	Algarve	5	M	<i>Theileria</i>	-	-	-	+	-
16-00097	Lisboa	N.D	M	-	-	-	-	+	-
16-00098	Lisboa	N.D	M	-	-	-	-	+	-
16-03056	Santarém	8	F	<i>Theileria, Babesia</i>	-	+	<i>B. lus</i>	+	-
16-03069	Portalegre	N.D	N.D	<i>Theileria</i>	-	+	<i>B. af</i>	+	-

F-feminino; M-masculino; -Negativo; + Positivo; Duv-Duvidoso; Neg-Negativo; N.D–Não determinada; *B. af* – *B. afzelii*; *B. val* – *B. valaisiana*; *B.b.s.s.* – *B. burgdorferi* s.s.; *B. lus* – *B. lusitaniae*

